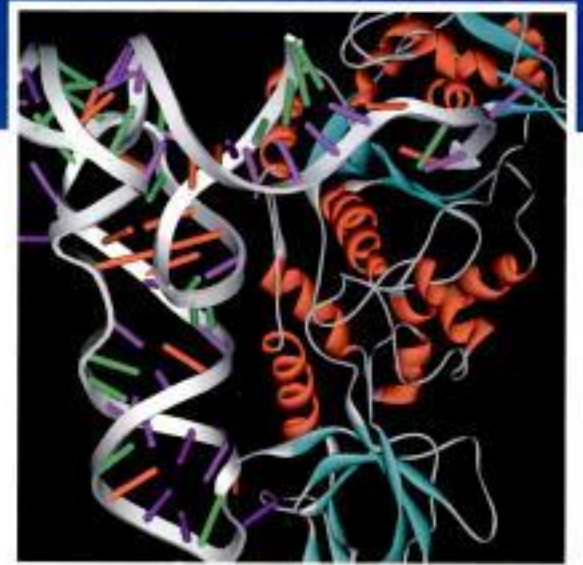


# BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Collection dirigée par J. Figarella et A. Calas

3<sup>e</sup> édition

G. Coutouly, E. Klein, E. Barbieri,  
M. Kriat



BIBLIOTHEQUE SCIENTIFIQUE FB

**CONFIDENTIEL**

## Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique

*BIBLIOTHEQUE SCIENTIFIQUE FB*

**CONFIDENTIEL**

**BIOSCIENCES  
ET TECHNIQUES**

Collection dirigée  
par J. Figarella et A. Calas

*BIBLIOTHEQUE SCIENTIFIQUE FB*

**CONFIDENTIEL**

# **Travaux dirigés** de biochimie biologie moléculaire et bioinformatique

**Gérard Coutouly**

Professeur de Biochimie-Génie biologique,  
Lycée Jean Rostand, Strasbourg

**Émile Klein**

Professeur de Biochimie-Génie biologique  
Lycée Jean Rostand, Strasbourg

**Éric Barbieri**

Professeur de Biochimie-Génie biologique  
Lycée Jean Rostand, Strasbourg

**Mostafa Kriat**

Professeur de Biochimie-Génie biologique  
Lycée Marie Curie, Marseille

**3<sup>e</sup> édition**

**doin**

This One



D6W3-H68-FST1

digitized material

# Chez le même éditeur

## **Analyses biologiques, sujets de BTS corrigés**

J. Allay, M. Charrin, C. Plas, M. Rivière, P. Vanneste, S. Vanneste

## **Biochimie métabolique**

Cl. Audigié, F. Zonszain, 3<sup>e</sup> édition

## **Biochimie structurale**

Cl. Audigié, F. Zonszain, 2<sup>e</sup> édition

## **Principes des méthodes d'analyse biochimique**

Cl. Audigié, G. Dupont, F. Zonszain

Tome 1, 2<sup>e</sup> édition

Tome 2, 2<sup>e</sup> édition

## **Exercices de biochimie**

F. Lafont, C. Plas, P. Cazaubon, 2<sup>e</sup> édition

## **Biotechnologies. Principes et méthodes**

M. Larpent-Gourgaud, J.-J. Sanglier

## **Génie enzymatique. Travaux pratiques**

D. Loncle

## **Génie génétique**

D. Loncle, M. Amaudric, C. Jacoty

## **Manipulations d'analyse biochimique**

M. Gavrilovic, M.-J. Maginot, Cl. Schwartz-Gavrilovic, J. Wallach

3<sup>e</sup> édition revue et corrigée

## **Précis de physiologie**

A. Calas, J.-F. Perrin, C. Plas, P. Vanneste

## **Expérience faciles et moins faciles en sciences biologiques**

R. Perrier, T. Auffret van der Kemp, F. Zonszain

## **Éléments de biologie cellulaire**

D. Robert, B. Vian, 3<sup>e</sup> édition, 2004

## **Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés**

A. Meyer, J. Deiana, A. Bernard, 2<sup>e</sup> édition, 2004

## **Microbiologie et toxicologie des aliments**

G. Leyral, E. Vierling

## **Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires**

G. Bonnefoy, F. Guillet, G. Leyral, F. Verne

## **DOIN ÉDITEURS**

Groupe Liaisons SA (Wolters Kluwer France)

Case postale 811

1, rue Eugène et Armand Peugeot

92856 Rueil-Malmaison Cedex

Librairie en ligne : [www.editionsdoin.fr](http://www.editionsdoin.fr)

© 2006 Groupe Liaisons SA

ISBN 2-7040-1215-6

ISSN 1629-7954

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (loi du 11 mars 1957-art.40 et 41 et Code pénal art. 425).

Toutefois, des photocopies peuvent être réalisées avec l'autorisation de l'éditeur. Celle-ci pourra être obtenue auprès du Centre français du copyright, 20, rue des Grands-Augustins - 75006 Paris, auquel l'éditeur a donné mandat pour le représenter auprès des utilisateurs.

# SOMMAIRE

|                                                                                       |            |  |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|--|--|
| Préface                                                                               | V          |  |  |
| Avant-propos                                                                          | VI         |  |  |
| <b>I. NOTIONS PRÉLIMINAIRES</b>                                                       | <b>1</b>   |  |  |
| <b>1. Notions préliminaires</b>                                                       | <b>2</b>   |  |  |
| Rappels mathématiques                                                                 | 2          |  |  |
| Grandeurs et constantes utilisées au laboratoire de biochimie                         | 3          |  |  |
| Chimie générale et organique                                                          | 4          |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 24                                                              | 9          |  |  |
| Corrigés 1 à 24                                                                       | 14         |  |  |
| <b>II. LES BIOMOLÉCULES ET LEUR TRANSFORMATION</b>                                    | <b>27</b>  |  |  |
| <b>2. Glucides</b>                                                                    | <b>28</b>  |  |  |
| Oses                                                                                  | 28         |  |  |
| 1. Définition                                                                         | 28         |  |  |
| 2. Structure et nomenclature                                                          | 28         |  |  |
| 3. Propriétés des oses                                                                | 30         |  |  |
| 4. Dosage d'oses et d'osides simples                                                  | 31         |  |  |
| 5. Principaux oses et diholosides                                                     | 32         |  |  |
| Osides                                                                                | 33         |  |  |
| 1. Holosides                                                                          | 33         |  |  |
| 2. Hétérosides                                                                        | 34         |  |  |
| 3. Glycoconjugués                                                                     | 34         |  |  |
| Éléments sur le métabolisme des glucides                                              | 35         |  |  |
| 1. Métabolisme des glucides (schéma simplifié)                                        | 35         |  |  |
| 2. Glycolyse et cycle de Krebs                                                        | 36         |  |  |
| 3. Métabolisme des principaux glucides et interrelation avec les autres métabolismes  | 37         |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 18                                                              | 38         |  |  |
| Corrigés 1 à 18                                                                       | 46         |  |  |
| <b>3. Lipides</b>                                                                     | <b>56</b>  |  |  |
| 1. Structure et propriétés                                                            | 56         |  |  |
| 2. Méthodes d'étude                                                                   | 58         |  |  |
| 3. Autres composés apparentés aux lipides                                             | 59         |  |  |
| 4. Dégradation et biosynthèse des acides gras                                         | 60         |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 12                                                              | 61         |  |  |
| Corrigés 1 à 12                                                                       | 65         |  |  |
| <b>4. Protides</b>                                                                    | <b>74</b>  |  |  |
| Acides aminés                                                                         | 74         |  |  |
| 1. Structure des acides aminés                                                        | 74         |  |  |
| 2. Propriétés des acides aminés                                                       | 75         |  |  |
| 3. Méthodes d'étude des acides aminés                                                 | 77         |  |  |
| Peptides et protéines                                                                 | 78         |  |  |
| 1. Structure des peptides et des protéines                                            | 78         |  |  |
| 2. Propriétés des peptides et des protéines                                           | 83         |  |  |
| 3. Dosage des peptides et des protéines                                               | 85         |  |  |
| 4. Extraction-purification des protéines; contrôles de pureté des protéines           | 86         |  |  |
| Interactions protéine ligand                                                          | 87         |  |  |
| 1. Exemples                                                                           | 87         |  |  |
| 2. Modélisation de la fixation d'un ligand L sur un site récepteur R                  | 87         |  |  |
| 3. Techniques d'étude                                                                 | 87         |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 21                                                              | 88         |  |  |
| Corrigés 1 à 21                                                                       | 96         |  |  |
| <b>5. Enzymes</b>                                                                     | <b>112</b> |  |  |
| 1. Vitesse de réaction, activité enzymatique et modes d'expression                    | 112        |  |  |
| 2. Extraction-purification; enrichissement et rendement                               | 113        |  |  |
| 3. Facteurs déterminant l'activité enzymatique                                        | 113        |  |  |
| 4. Coenzymes                                                                          | 116        |  |  |
| 5. Détermination d'activités enzymatiques                                             | 117        |  |  |
| 6. Dosage de substrats                                                                | 118        |  |  |
| 7. Systèmes à deux substrats et deux produits (Bi-Bi)                                 | 119        |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 28                                                              | 121        |  |  |
| Corrigés 1 à 28                                                                       | 138        |  |  |
| <b>6. Bioénergétique</b>                                                              | <b>153</b> |  |  |
| 1. Principes de la thermodynamique d'équilibre                                        | 153        |  |  |
| 2. Enthalpie libre, enthalpie libre standard et constante d'équilibre d'une réaction  | 154        |  |  |
| 3. Principaux composés à haut potentiel d'hydrolyse et notion de couplage énergétique | 156        |  |  |
| 4. Formation de composés à haut potentiel d'hydrolyse-Exemples                        | 157        |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 8                                                               | 159        |  |  |
| Corrigés 1 à 8                                                                        | 162        |  |  |
| <b>7. Initiation à la modélisation des réacteurs biologiques</b>                      | <b>167</b> |  |  |
| 1. Généralités                                                                        | 167        |  |  |
| 2. Écoulements dans les réacteurs continus                                            | 167        |  |  |
| 3. Réacteurs enzymatiques                                                             | 168        |  |  |
| 4. Les fermenteurs                                                                    | 170        |  |  |
| Exercices Énoncés 1 à 7                                                               | 173        |  |  |
| Corrigés 1 à 7                                                                        | 176        |  |  |
| <b>III. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET BIOINFORMATIQUE</b>                                   | <b>183</b> |  |  |
| <b>8. Biologie moléculaire et génie génétique</b>                                     | <b>184</b> |  |  |
| 1. Constituants des nucléosides, nucléotides et acides nucléiques                     | 184        |  |  |
| 2. Nucléosides, nucléotides                                                           | 184        |  |  |

|                                                                                                                                                |            |                                                                                 |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3. Polynucléotides                                                                                                                             | 185        | 5. Applications                                                                 | 287        |
| 4. ADN                                                                                                                                         | 186        | <i>Électrophorèse en gel de polyacrylamide</i>                                  | 288        |
| 5. ARN                                                                                                                                         | 188        | 1. Constituants                                                                 | 288        |
| <u>6. Organisation des gènes eucaryotes et procaryotes</u>                                                                                     | <u>190</u> | 2. Obtention                                                                    | 288        |
| <u>7. Enzymes utilisées en génie génétique</u>                                                                                                 | <u>191</u> | 3. Appareillage et mise en œuvre                                                | 288        |
| <u>8. Vecteurs</u>                                                                                                                             | <u>192</u> | 4. Propriétés (PAGE)                                                            | 288        |
| 9. ADN recombiné et clonage                                                                                                                    | 194        | 5. Applications                                                                 | 288        |
| 10. Banques génomiques et banques d'ADNc                                                                                                       | 195        | <i>Focalisation isoélectrique</i>                                               | 289        |
| 11. Sondes moléculaires                                                                                                                        | 196        | 1. Principe                                                                     | 289        |
| 12. Southern-blot                                                                                                                              | 197        | 2. Appareillage et mise en œuvre                                                | 289        |
| 13. Séquençage par la méthode de Sanger-Coulson                                                                                                | 198        | 3. Applications                                                                 | 289        |
| 14. Séquençage automatique                                                                                                                     | 199        | <i>Électrophorèse capillaire</i>                                                | 289        |
| 15. Amplification en chaîne par polymérase (ACP)<br>ou « Polymerase Chain Reaction » (PCR)                                                     | 200        | 1. Principe                                                                     | 289        |
| <u>Exercices Énoncés 1 à 12</u>                                                                                                                | <u>203</u> | 2. Appareillage et mise en œuvre                                                | 289        |
| <u>Corrigés 1 à 12</u>                                                                                                                         | <u>209</u> | 3. Applications                                                                 | 289        |
| <b>9. Bioinformatique</b>                                                                                                                      | <b>217</b> | <i>Exercices Énoncés 1 à 10</i>                                                 | <i>290</i> |
| 1. Banques de données biologiques                                                                                                              | 217        | <i>Corrigés 1 à 10</i>                                                          | <i>296</i> |
| 2. Outils de la bioinformatique                                                                                                                | 218        | <b>12. Méthodes optiques</b>                                                    | <b>302</b> |
| 3. Principes de base de l'alignement de séquences                                                                                              | 219        | <i>Spectrophotométrie d'absorption moléculaire</i>                              | <i>302</i> |
| 4. Alignement global                                                                                                                           | 220        | 1. Principe                                                                     | 302        |
| 5. Alignement local                                                                                                                            | 221        | 2. Appareillage                                                                 | 302        |
| 6. Alignement multiple                                                                                                                         | 222        | 3. Applications                                                                 | 302        |
| 7. Phytogénétique moléculaire                                                                                                                  | 223        | <i>Spectrophotométrie d'émission moléculaire : fluorescence</i>                 | 303        |
| 8. Recherche de motifs et de domaines                                                                                                          | 224        | 1. Principe                                                                     | 303        |
| 9. Analyse, visualisation et modélisation de structures                                                                                        | 224        | 2. Appareillage                                                                 | 303        |
| <u>Exercices Énoncés 1 à 16</u>                                                                                                                | <u>226</u> | 3. Applications                                                                 | 303        |
| <u>Corrigés 1 à 16</u>                                                                                                                         | <u>231</u> | <i>Spectrophotométrie d'émission atomique</i>                                   | 304        |
| <b>IV. PRINCIPALES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES<br/>AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE</b>                                                          | <b>253</b> | 1. Principe                                                                     | 304        |
| <b>10. Méthodes chromatographiques</b>                                                                                                         | <b>254</b> | 2. Appareillage                                                                 | 304        |
| <i>Étude théorique de la chromatographie</i>                                                                                                   | <i>254</i> | 3. Applications analytiques                                                     | 304        |
| 1. Notion de plateaux théoriques                                                                                                               | 254        | <i>Spectrophotométrie d'absorption atomique</i>                                 | 304        |
| 2. Étude cinétique                                                                                                                             | 258        | 1. Principe                                                                     | 304        |
| <i>Schématisation des interactions entre solutés<br/>et phase stationnaire dans les principales méthodes<br/>chromatographiques classiques</i> | <i>259</i> | 2. Appareillage                                                                 | 304        |
| <i>Diverses classifications des chromatographies</i>                                                                                           | <i>260</i> | 3. Applications analytiques                                                     | 304        |
| <i>Tableau des principales méthodes<br/>chromatographiques</i>                                                                                 | <i>261</i> | <i>Exercices Énoncés 1 à 13</i>                                                 | <i>305</i> |
| <i>Chromatographie liquide haute performance<br/>(« High performance Liquid Chromatography »)</i>                                              | <i>263</i> | <i>Corrigés 1 à 13</i>                                                          | <i>315</i> |
| <u>Exercices Énoncés 1 à 15</u>                                                                                                                | <u>264</u> | <b>V QUALITÉ AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE</b>                                    | <b>325</b> |
| <u>Corrigés 1 à 15</u>                                                                                                                         | <u>277</u> | <b>13. Qualité au laboratoire de biochimie</b>                                  | <b>326</b> |
| <b>11. Méthodes électrophorétiques</b>                                                                                                         | <b>285</b> | <i>Qualité d'un point de vue pratique</i>                                       | <i>326</i> |
| <i>Principes généraux de l'électrophorèse</i>                                                                                                  | <i>285</i> | 1. Erreurs systématiques et aléatoires                                          | 326        |
| 1. Définition                                                                                                                                  | 285        | 2. Concordance entre deux essais ( $E_1$ et $E_2$ )                             | 326        |
| 2. Principe (en veine liquide)                                                                                                                 | 285        | 3. Expression d'un résultat final-Chiffres significatifs                        | 326        |
| 3. Effets de divers paramètres sur la mobilité<br>électrophorétique $u$                                                                        | 285        | <i>Qualité au laboratoire de biochimie :</i><br><i>expression des résultats</i> | <i>327</i> |
| <i>Électrophorèse en gel d'agarose</i>                                                                                                         | <i>287</i> | 1. Définitions                                                                  | 327        |
| 1. Constituants                                                                                                                                | 287        | 2. Les erreurs expérimentales                                                   | 328        |
| 2. Obtention                                                                                                                                   | 287        | 3. Calcul différentiel d'erreur                                                 | 328        |
| 3. Appareillage et mise en œuvre                                                                                                               | 287        | 4. Évaluation statistique des erreurs aléatoires                                | 330        |
| 4. Propriétés                                                                                                                                  | 287        | <u>Exercices Énoncés 1 à 6</u>                                                  | <u>333</u> |
|                                                                                                                                                |            | <u>Corrigés 1 à 6</u>                                                           | <u>340</u> |

# PRÉFACE

Cette troisième édition est plus qu'une écriture revue et corrigée des éditions précédentes. C'est pratiquement un livre nouveau, une version très actualisée et très modernisée de l'œuvre d'origine.

Les sciences et les techniques du vivant évoluent rapidement ; la biologie moléculaire et la bioinformatique y ont pris une importance considérable les technologies correspondantes sont devenues extrêmement sophistiquées et les formations de techniciens ont dû relever rapidement ces nouveaux défis.

Les livres d'exercices de biochimie ne sont pas très nombreux. En tous cas, peu d'entre eux rassemblent, comme cet ouvrage, autant de données essentielles et peu conjuguent, comme lui avec autant de bonheur, les aspects scientifiques et les aspects technologiques. Il propose en effet des exercices nombreux et variés qui mettent « en situation » les connaissances scientifiques, qui les prolongent ou qui les explicitent. En associant les données théoriques à leurs applications pratiques, il donne « l'intelligence » des modes opératoires.

Son originalité tient en trois points :

- **des exercices** qui balayent largement tous les domaines de la biochimie, de la biologie moléculaire et de la bioinformatique, tant sur le plan des concepts scientifiques que sur le plan de leurs applications technologiques. Ces exercices sont gradués dans la difficulté et permettent à chacun d'évaluer ses connaissances et sa compréhension des cours. Des corrigés très explicites permettent à l'élève ou à l'étudiant d'avancer à son rythme, de s'évaluer et d'analyser les causes des réponses erronées. Le caractère pédagogique de ces exercices permet également de démystifier certains domaines jugés trop abstraits ou trop complexes. Dans des domaines nouveaux comme ceux de la biologie moléculaire et de la bioinformatique, les auteurs font œuvre de pionnier en proposant des exercices simples et diversifiés ;

- **des résumés de cours** qui ouvrent chaque chapitre et qui rassemblent l'essentiel des connaissances requises pour résoudre les exercices. Ils ne dispensent pas pour autant l'étudiant d'apprendre son cours mais ils lui permettent de dégager ce qui est fondamental et de créer de l'appétence pour un approfondissement des thèmes proposés ;

- **un cédérom**, supplément désormais incontournable de l'écrit classique à l'ère des technologies de l'information et de la communication. Ces nouveaux outils numériques investissent en effet de plus en plus le champ pédagogique en général et celui de la biologie technique en particulier.

Conjuguer à la fois exhaustivité et concision, proposer et construire dans chaque chapitre des exercices originaux de niveaux différents, marier aussi habilement sciences et technologies constitue une entreprise difficile qui n'a pu être menée à terme que grâce à la compétence et au talent des auteurs, excellents pédagogues, professeurs ayant une solide expérience de la formation des techniciens à différents niveaux. Leur coopération exemplaire aboutit à cet ouvrage remarquable qui sera utile à tous ceux qui s'intéressent à la biochimie et à ses applications technologiques.

Jean FIGARELLA

Inspecteur général honoraire de l'Éducation nationale

Ancien doyen de l'Inspection générale de sciences et techniques industrielles

# AVANT-PROPOS

La biochimie connaît, ces dernières années, de nombreux changements. Les techniques d'analyse et de dosage des biomolécules montrent des progrès significatifs : les méthodes optiques deviennent des outils essentiels du biochimiste, les techniques comme la chromatographie et l'électrophorèse voient leur constante amélioration et l'utilisation de « kits » pour les dosages et les extractions/purifications est courante.

Ces techniques permettent une étude de plus en plus fine des biomolécules et en particulier des macromolécules informatives telles que les acides nucléiques et les protéines. La biochimie se doit, dès lors, pour l'étude des phénomènes biologiques, d'intégrer l'aspect « biologie moléculaire » et les techniques du génie génétique. Dans ce domaine, l'accumulation des connaissances est telle que le développement de nouveaux outils informatiques est indispensable. Avec eux, une discipline nouvelle est née : la bioinformatique.

L'obtention à grande échelle de biomolécules par les industries pharmaceutiques et les industries agro-alimentaires, conformes à une législation de plus en plus exigeante, impose, quant à elle, la mise au point d'un contrôle qualité opérationnel, un des éléments de l'assurance qualité. Cette assurance qualité relève, en fait, de tous les domaines des « biotechnologies » : laboratoire de biochimie clinique, laboratoire de recherche, laboratoire d'enseignement...

Bien évidemment, nos formations s'adaptent à cette évolution. Ainsi, le baccalauréat technologique « Sciences et techniques de laboratoire » (STL) option « Biochimie - Génie biologique » et les brevets de technicien supérieur évoluent grâce à des rénovations de programmes. Les BTS « Analyses biologiques », « Bio-analyses et contrôles », « Biotechnologies », « Qualité dans les industries alimentaires et les bioindustries » et « Métiers de l'eau » sont autant de formations spécialisées qui répondent aux attentes des professionnels du secteur des bio-industries ou des laboratoires, en terme de compétences et de savoirs.

De même, le programme des classes préparatoires aux grandes écoles TB évolue, lui aussi en intégrant, entre autres, la dimension « génie biologique ».

La prise en compte des évolutions de la biochimie a présidé à l'élaboration de cette 3<sup>e</sup> édition et nombreux ont été les changements depuis la publication des deux premières éditions de cet ouvrage.

Ainsi les résumés de cours et les exercices proposés ont-ils été adaptés à la nouvelle répartition des techniques et aux nouveaux contenus des formations de l'enseignement technologique pré- et post-baccalauréat. Nous avons distingué en bleu les notions et les exercices de niveau post-baccalauréat.

De plus, la montée en puissance des Techniques de l'Information de la Communication appliquées à l'Enseignement (TICE) a été prise en compte par l'ajout, à titre expérimental, d'un supplément cédérom. Celui-ci contient des compléments aux chapitres : « Enzymologie » et « Bioinformatique » mais aussi des exercices d'autoévaluation.

Nous tenons à remercier :

- M. Cédric Notredame, chargé de recherche au CNRS, au laboratoire « Information génomique et structurale » à Marseille, d'avoir accepté de relire le chapitre bioinformatique ;

- M. Paul Stothard, chercheur de l'université de l'Alberta (Canada), de nous avoir autorisé à intégrer la suite « Séquence Manipulation Suite » dans le cédérom.

Ainsi, espérons-nous continuer, grâce à cet ouvrage, à apporter notre contribution à l'apprentissage des connaissances de base de la biochimie.

Strasbourg, Marseille  
Juin 2006  
Les auteurs



I

# ***NOTIONS PRÉLIMINAIRES***

# 1 - Notions préliminaires

## Rappels mathématiques

### 1. Puissances de 10

$$\underbrace{10\,000 \dots 00}_{\alpha \text{ zéros}} = 10^\alpha$$

$$\underbrace{0,0\,000 \dots 001}_{\beta \text{ zéros}} = 10^{-\beta}$$

Multiples et sous multiples des unités :

| Facteur    | Préfixe | Symbole |
|------------|---------|---------|
| $10^{-3}$  | milli   | m       |
| $10^{-6}$  | micro   | $\mu$   |
| $10^{-9}$  | nano    | n       |
| $10^{-12}$ | pico    | p       |

| Facteur   | Préfixe | Symbole |
|-----------|---------|---------|
| $10^3$    | kilo    | k       |
| $10^6$    | méga    | M       |
| $10^9$    | giga    | G       |
| $10^{12}$ | téra    | T       |

### 2. Résolution d'une équation du second degré

$$a \cdot x^2 + b \cdot x + c = 0 \quad \Delta = b^2 - 4 \cdot a \cdot c \quad \text{d'où} \quad x = \frac{-b \pm \sqrt{\Delta}}{2 \cdot a}$$

### 3. Logarithmes et exponentielles

|                                                                              |                                            |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| $\log_{10} a = \log a = \alpha$ logarithme décimal de a d'où $a = 10^\alpha$ | $\log_x (A \cdot B) = \log_x A + \log_x B$ |
| $\log_e b = \ln b = \beta$ logarithme népérien de b d'où $b = e^\beta$       |                                            |
| $\log_x y = \gamma$ logarithme de base x de y d'où $y = x^\gamma$            | $\log_x C^d = d \log_x C$                  |

### 4. Régression et modélisations

Les points expérimentaux (N couples de valeurs  $x_i, y_i$ ), obtenus lors du traitement de résultats expérimentaux peuvent être, selon le cas, modélisés de diverses manières. Parmi celles-ci, il faut citer :

- **Relation linéaire ( $y = a x + b$ )** : il est possible de déterminer le **coefficient de corrélation**, paramètre qui quantifie la dispersion (non alignement) de ces valeurs.

N : nombre de couples de valeurs

a : coefficient directeur de la droite de régression

$$a = \frac{\sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{N}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}$$

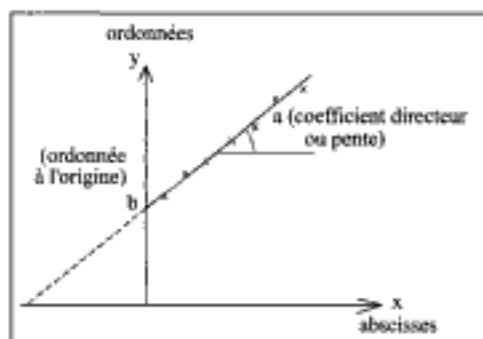
b : ordonnée à l'origine de la droite de régression

$$b = \frac{\sum y_i - a \cdot \sum x_i}{N}$$

r : coefficient de corrélation

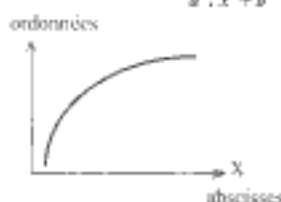
$$r = \frac{a \cdot \sigma_x}{\sigma_y}$$

avec  $\sigma_x$  : écart type des x et  $\sigma_y$  : écart type des y

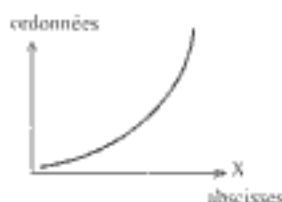


- Autres relations

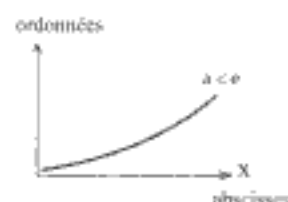
Relation hyperbolique ( $y = \frac{a \cdot x + b}{a' \cdot x + b'}$ )



Relation exponentielle ( $y = e^x$ )



Relation puissance ( $y = a^x$ )



### 5. Primitives

|            |               |                   |                    |
|------------|---------------|-------------------|--------------------|
| Fonctions  | $\frac{1}{x}$ | $\frac{1}{x + u}$ | $e^{vx}$           |
| Primitives | $\ln x$       | $\ln (x + u)$     | $\frac{e^{vx}}{v}$ |

## Quelques grandeurs et constantes utilisées au laboratoire de biochimie

*(en italique, les unités usuelles en biochimie n'appartenant pas au Système International (S.I.))*

| Nom                                                               | Symbole        | Unité S.I.                                                   | Définition                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Longueur                                                          | m              | mètre                                                        | Longueur du trajet parcouru par la lumière dans le vide pendant une durée de 1/299 792 458 de seconde.                                                                                                                                                                                       |
| Volume                                                            | V              | mètre cube (m <sup>3</sup> )<br><i>(dm<sup>3</sup> ou L)</i> | $\iiint dx, dy, dz$ où x, y, et z sont les coordonnées cartésiennes.                                                                                                                                                                                                                         |
| Masse                                                             | kg             | kilogramme<br><i>(g)</i>                                     | Masse du kilogramme étalon international de platine irridié déposé au Bureau International des poids et mesures, au Pavillon de Breteuil à Sèvres.                                                                                                                                           |
| Température thermodynamique                                       | T              | Kelvin                                                       | Fraction 1 / 273,16 de la température thermodynamique du point triple de l'eau.                                                                                                                                                                                                              |
| Température                                                       | °C             | °Celsius                                                     | $t(^{\circ}\text{C}) = T(\text{K}) - 273,16$ .                                                                                                                                                                                                                                               |
| Temps                                                             | s              | seconde                                                      | Durée de 9 162 631 770 périodes de la radiation correspondant à la transition entre deux niveaux hyperfins de l'état fondamental de l'atome de césium 133.                                                                                                                                   |
| Nombre de molécules                                               | N              |                                                              | Nombre d'entités élémentaires.                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Quantité de matière                                               | n              | mol (mole)                                                   | Quantité de matière d'un système contenant autant d'unités élémentaires qu'il y a d'atomes dans 0,012 kg de carbone 12. Le nom des entités élémentaires doit être précisé : ions, molécules, électrons, particules, ...                                                                      |
| Constante d'Avogadro                                              | N <sub>A</sub> | mol <sup>-1</sup>                                            | Quotient du nombre de molécules par la quantité de matière ;<br>$N_A = N / n$ ; $N_A = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ .                                                                                                                                                           |
| Masse molaire                                                     | M              | kg . mol <sup>-1</sup><br><i>(g . mol<sup>-1</sup>)</i>      | Quotient de la masse par la quantité de matière.<br>$M = m / n$ ; m = masse du corps. Se décline en "masse molaire atomique" et "masse molaire moléculaire".                                                                                                                                 |
| Masse molaire (macromolécules)                                    | Da             | Dalton                                                       | Le carbone 12 a une masse de 12 daltons ; un dalton correspond donc à N <sup>-1</sup> g soit 1,663 . 10 <sup>-24</sup> g ; une masse molaire exprimée en daltons est numériquement identique à une masse molaire exprimée en g . mol <sup>-1</sup> .                                         |
| Concentration en masse                                            | ρ <sub>B</sub> | kg . m <sup>-3</sup><br><i>(g . L<sup>-1</sup>)</i>          | Quotient de la masse du constituant B par le volume du mélange.                                                                                                                                                                                                                              |
| Masse volumique                                                   | ρ              | kg . m <sup>-3</sup><br><i>(g . L<sup>-1</sup>)</i>          | Quotient de la masse par le volume.                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Densité                                                           | d              |                                                              | Rapport de la masse d'un corps à la masse volumique d'un corps de référence dans des conditions qui doivent être spécifiées pour les deux corps.                                                                                                                                             |
| Concentration en quantité de matière de B (concentration molaire) | C <sub>B</sub> | mol . m <sup>-3</sup><br><i>(mol . L<sup>-1</sup>)</i>       | Quotient de la quantité de matière du constituant B par le volume du mélange ; anciennement appelée "molarité de B" ; ici, les solutions étant diluées, seront confondues l'activité de B notée (B) et la concentration en quantité de matière de B notée [B] ; ainsi, pour nous, (B) = [B]. |
| Force ionique                                                     | I<br>μ         | mol . m <sup>-3</sup><br><i>(mol . L<sup>-1</sup>)</i>       | Expression de la concentration compte tenu du nombre de charges électriques.<br>$I = \mu = 1/2 \sum C_i \cdot z_i^2$ avec C <sub>i</sub> : concentration molaire de l'espèce ionique i et z <sub>i</sub> : charge de l'espèce ionique i.                                                     |
| Osmolarité                                                        |                | osmol . m <sup>-3</sup><br><i>(osmol . L<sup>-1</sup>)</i>   | Expression de la concentration compte tenu du nombre de particules présentes ; charges électriques.                                                                                                                                                                                          |
| Constante molaire des gaz                                         | R              | J . mol <sup>-1</sup> . K <sup>-1</sup>                      | Constante de proportionnalité dans la loi des gaz parfaits ;<br>$R = 8,314510 \text{ J . mol}^{-1} . \text{K}^{-1}$ ;<br>classiquement arrondi à 8,32 J . mol <sup>-1</sup> . K <sup>-1</sup> .                                                                                              |

# Chimie générale et organique

## 1. Tableau périodique et structure électronique

### 1.1. Tableau périodique

Premières lignes du tableau périodique des éléments (simplifié) : symbole et masse molaire atomique ( $\text{g mol}^{-1}$ )

|          |             |             |             |             |             |             |             |             |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Couche K | H<br>1,01   |             |             |             |             |             |             | He<br>4,00  |
| Couche L | Li<br>6,94  | Be<br>9,01  | B<br>10,81  | C<br>12,01  | N<br>14,01  | O<br>16,00  | F<br>18,00  | Ne<br>20,18 |
| Couche M | Na<br>22,99 | Mg<br>24,31 | Al<br>26,98 | Si<br>28,09 | P<br>30,97  | S<br>32,06  | Cl<br>35,45 | Ar<br>39,45 |
| Couche N | K<br>39,10  | Ca<br>40,08 | Ga<br>69,72 | Ge<br>72,61 | As<br>74,92 | Se<br>78,96 | Br<br>79,91 | Kr<br>83,80 |

Masses molaires atomiques d'autres éléments

Mn 54,94    Fe 55,85    Cu 63,54    I 126,90

### 1.2. Structure électronique des principaux éléments

Structure externe et liaisons courantes

électron célibataire

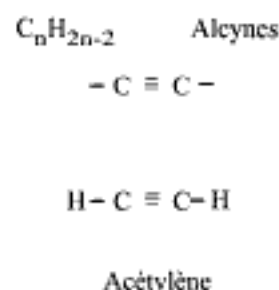
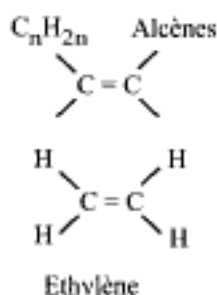
doublet électronique

|                                       | H                     | C                                                                                                                                                                                         | O                                                                                                                                                                                                                                               | N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | S                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Electrons totaux sur couche externe : |                       |                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| - doublets électroniques              | 1                     | 4                                                                                                                                                                                         | 6                                                                                                                                                                                                                                               | 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| - électrons célibataires              | 1                     | 4                                                                                                                                                                                         | 2                                                                                                                                                                                                                                               | 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Liaisons covalentes                   | 1                     | 4                                                                                                                                                                                         | 2                                                                                                                                                                                                                                               | 3/4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2/4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 3/5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                       | H<br> <br>H<br> <br>H | $\begin{array}{c}   \\ -\text{C}- \\   \\ \text{H} \\   \\ \text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$<br>$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \end{array}$<br>$-\text{C}\equiv$ | $\begin{array}{c}   \\ \text{O} \\   \\ \text{H} \\ \text{H}_2\text{O} \end{array}$<br>$\begin{array}{c}   \\ \text{O} \\   \\ \text{H} \\ \text{R-OH} \end{array}$<br>$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \end{array}$ | $\begin{array}{c}   \\ -\text{N}- \\   \\ \text{H} \\ \text{NH}_3 \end{array}$<br>$\begin{array}{c}   \\ \text{H} \\   \\ \text{R} \\ \text{R-NH}_2 \end{array}$<br>$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{N}^+-\text{H} \\   \\ \text{R} \\ \text{R-NH}_3^+ \end{array}$<br>$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{N}^+-\text{H} \\   \\ \text{H} \\ \text{NH}_4^+ \end{array}$ | $\begin{array}{c}   \\ \text{S} \\   \\ \text{H} \\ \text{H}_2\text{S} \end{array}$<br>$\begin{array}{c}   \\ \text{S} \\   \\ \text{R} \\ \text{R-SH} \end{array}$<br>$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{O}=\text{S}-\text{OH} \\   \\ \text{HO} \\ \text{H}_2\text{SO}_4 \end{array}$<br>$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{O}=\text{S}-\text{O}^- \\   \\ \text{O}^- \\ \text{SO}_4^{2-} \end{array}$ | $\begin{array}{c}   \\ -\text{P}- \\   \\ \text{HO} \\ // \\ \text{HO}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{HO} \\ \text{H}_3\text{PO}_4 \end{array}$<br>$\begin{array}{c}   \\ \text{HO}-\text{P}-\text{O}^- \\   \\ \text{HO} \\ \text{H}_2\text{PO}_4^- \end{array}$<br>$\begin{array}{c}   \\ \text{HO}-\text{P}-\text{O}^- \\   \\ \text{O}^- \\ \text{HPO}_4^{2-} \end{array}$<br>$\begin{array}{c}   \\ \text{O}^- \\   \\ \text{O}^- \\ \text{PO}_4^{3-} \end{array}$ |

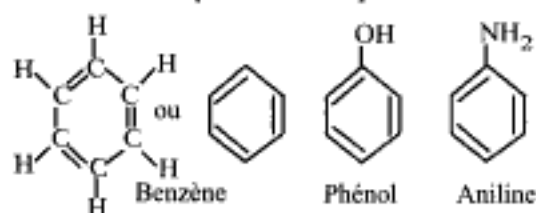
## 2. Principaux composés et principales fonctions chimiques

### Composés aliphatiques

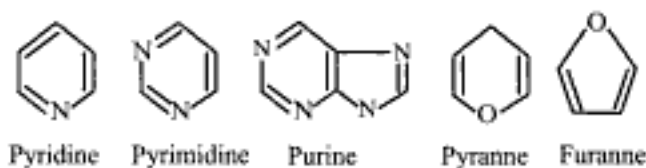
| $C_nH_{2n+2}$ | Alcane                                                            |         |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|---------|
|               | $\begin{array}{c}   \\ -C- \\   \end{array}$                      |         |
| n = 1         | CH <sub>4</sub>                                                   | méthane |
| n = 2         | CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>                                  | éthane  |
| n = 3         | CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>                 | propane |
| n = 4         | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> | butane  |
| n = 5         | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> | pentane |
| n = 6         | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub> | hexane  |
| n = 7         | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub> | heptane |
| n = 8         | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub> | octane  |
| n = 9         | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub> | nonane  |
| n = 10        | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub> | décane  |



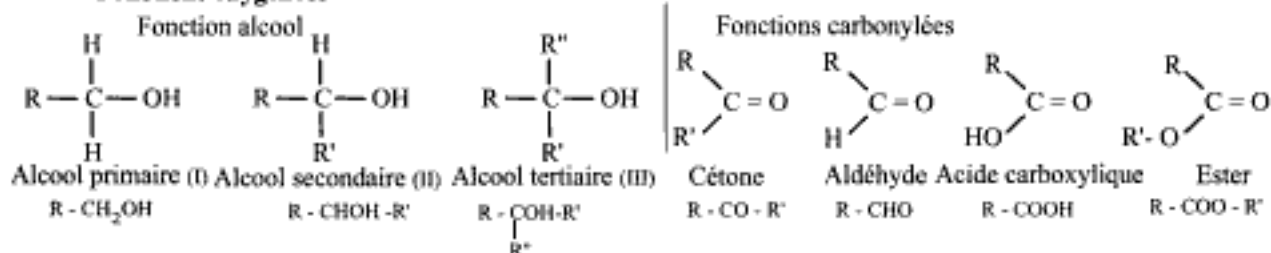
### Composés aromatiques



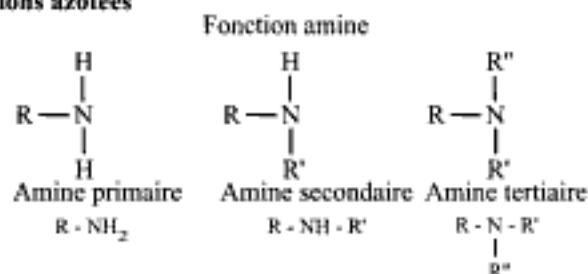
### Composés hétérocycliques



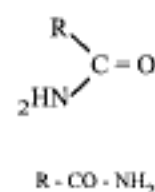
### Fonctions oxygénées



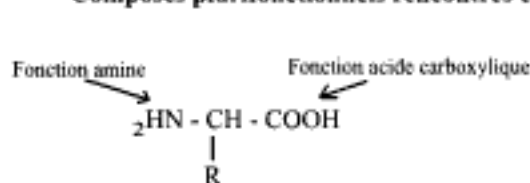
### Fonctions azotées



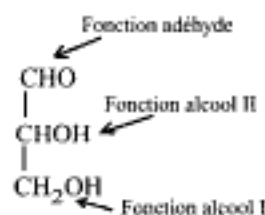
### Fonction amide



### Composés plurifonctionnels rencontrés en biochimie



Acide α-aminé (classiquement de la série L dans les protéines)



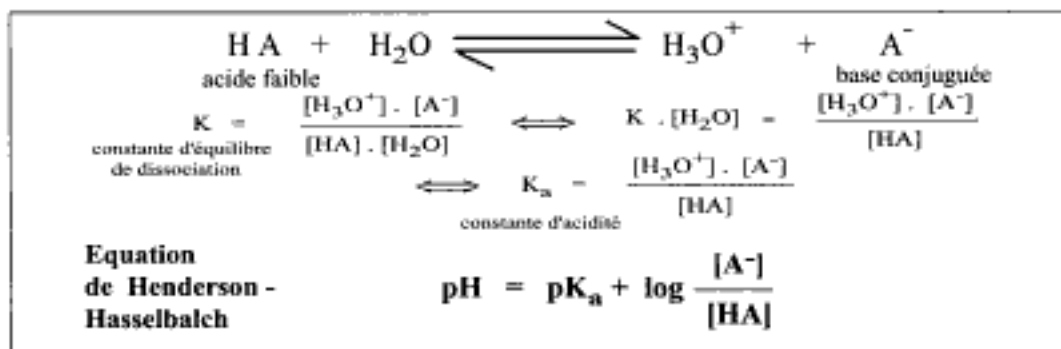
Ose (glucide simple ici glycéraldéhyde)

### 3. Acidobasicité

**Acide** : substance susceptible de libérer, en solution, des protons.

**Base** : substance susceptible de capter, en solution, des protons.

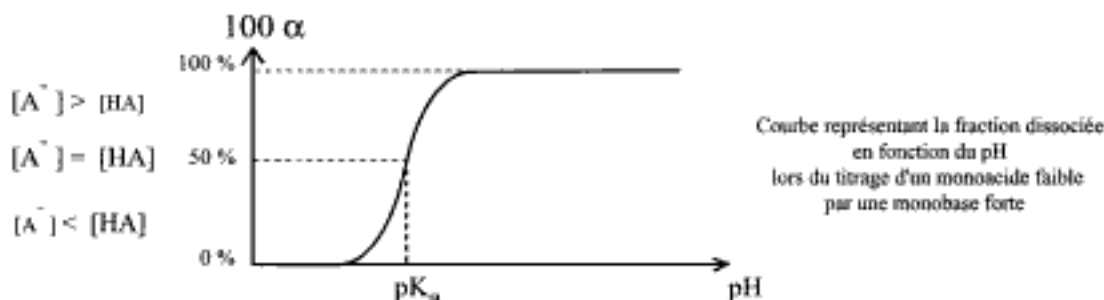
#### 3.1. Dissociation d'un monoacide faible en solution aqueuse



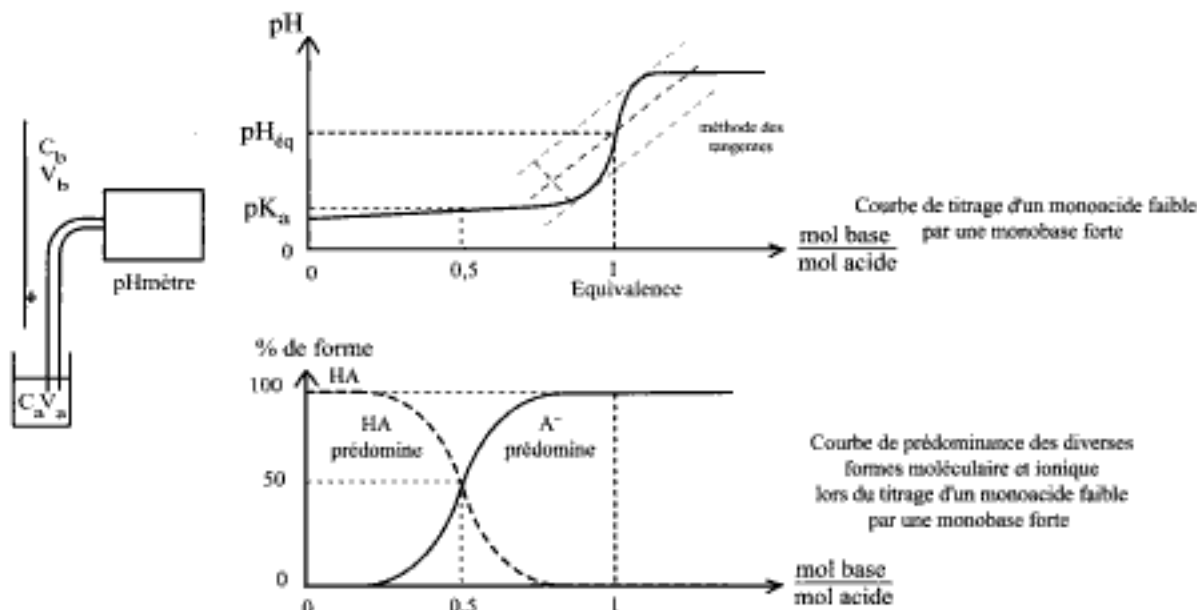
$$\alpha = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]}$$

$\alpha$  : fraction dissociée  
(souvent exprimé en %)

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$



#### 3.2. Courbe de titrage d'un monoacide faible par une monobase forte



### 3.3. Tampons

#### Définitions

Un tampon est une solution dont le pH varie peu :

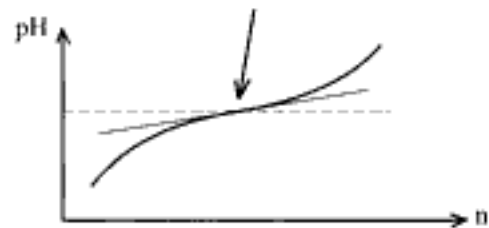
- lorsqu'on y ajoute un acide ou une base ;
- lorsqu'on la dilue.

#### Pouvoir tampon

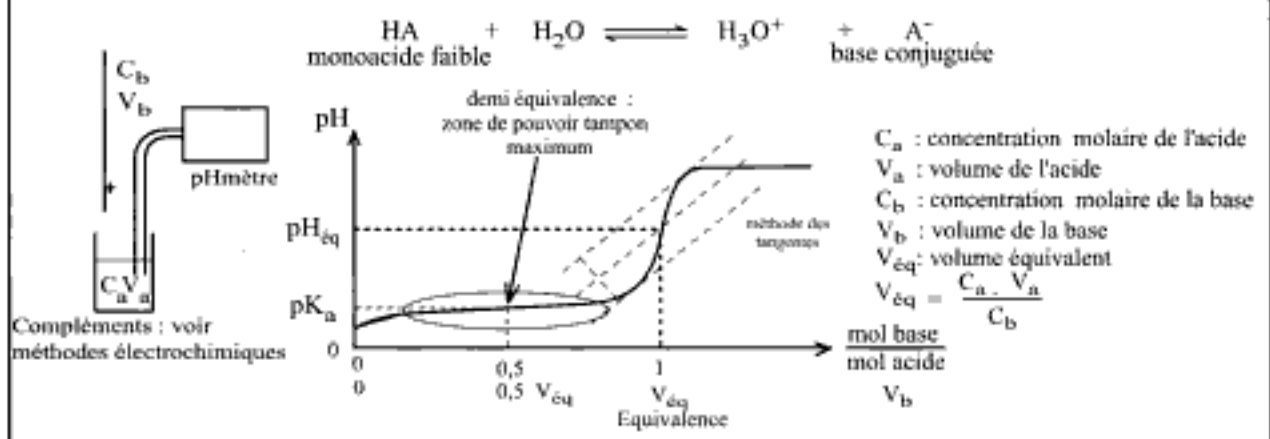
Le pouvoir tampon T est d'autant plus grand que le pH varie peu par ajout d'acide ou de base (n moles) ou par dilution : tangente à la courbe  $\text{pH} = f(n)$  proche de l'horizontale.

Un tampon est le mélange d'un acide faible et de sa base conjuguée.

zone de pouvoir tampon maximum



#### Cas de la courbe de titrage d'un monoacide faible par une monobase forte :



#### Préparation d'un tampon de concentration C

Utilisation de :

- l'équation de Henderson - Hasselbalch
- la loi de conservation de la matière :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$C = [\text{A}^-] + [\text{HA}]$$

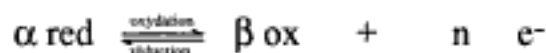
#### Divers tampons

| Acide faible   |                                     | Base conjuguée |                                              | Exemple d'utilisation<br>(pH d'utilisation : une unité en plus ou en moins du $\text{pK}_{a1}$ ) |
|----------------|-------------------------------------|----------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| État physique  | Composé                             | État physique  | Composé                                      |                                                                                                  |
| solide à peser | $\text{KH}_2\text{PO}_4$            | solide à peser | $\text{K}_2\text{HPO}_4$                     | tampon pH environ de 7 ( $\beta$ -galactosidase)                                                 |
| solide à peser | glycine isoelectrique               | liquide        | NaOH en solution pour obtenir $\text{Gly}^-$ | tampon glycine pH environ de 9 (PAL)                                                             |
| liquide        | acide acétique RP                   | solide à peser | acétate de sodium                            | tampon pH environ de 4,7 ( $\beta$ -fructosidase)                                                |
|                | HCl solution*                       |                | TRIS base                                    | tampon pH environ de 8 (biologie moléculaire)                                                    |
| liquide        | HCl solution*                       | liquide        | diéthanolamine                               | tampon pH environ de 8 (biochimie clinique méthodes optimisées)                                  |
|                | HCl solution*                       |                | triéthanolamine                              |                                                                                                  |
| gaz            | $\text{CO}_2$ (atmosphère enrichie) | liquide        | $\text{NaHCO}_3$ en solution                 | tampon pH environ de 7,5 (culture de cellules animales)                                          |

\* HCl sert à protoner une partie de la forme basique du tampon ; ainsi est obtenu le rapport  $[\text{A}^-] : [\text{HA}]$  permettant d'obtenir le pH désiré.

#### 4. Réactions d'oxydo - réduction

Certains corps existent sous deux formes (*forme réduite notée red et forme oxydée notée ox*) susceptibles d'échanger des électrons : il s'agit d'un couple redox. Cet échange se réalise au cours d'une réaction (équilibrée) d'oxydo-réduction écrite :



De gauche à droite, il y a oxydation, c'est à dire perte d'électrons ; de droite à gauche, il y a réduction, c'est à dire gain d'électrons.

A un couple redox donné correspond un potentiel E donné par la relation de Nernst (à condition qu'il n'y ait pas présence d'autres espèces ioniques) :

$$E = E_o + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{[\text{ox}]^\beta}{[\text{red}]^\alpha}$$

ou

$$E = E_o + \frac{0,06}{n} \log \frac{[\text{ox}]^\beta}{[\text{red}]^\alpha}$$

E : potentiel redox en volts .

E<sub>o</sub> : potentiel standard redox en volts ([Ox] = [Red] = 1 mol . L<sup>-1</sup> ; 298 K (25°C)).

R : constante des gaz parfaits = 8,32 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>.

F : Faraday = 96500 J.V<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>.

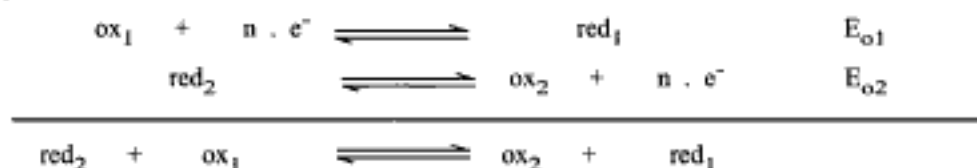
[ox] : concentration de la forme oxydée.

[red]: concentration de la forme réduite.

En biochimie, les potentiels sont classiquement considérés à pH = 7, d'où les grandeurs E', E'<sub>o</sub>, ...

Plus un système redox a un potentiel redox bas, plus il a tendance à céder ses électrons, plus il est capable de réduire un autre couple, c'est à dire plus il est réducteur. De même, plus un système a un potentiel haut, plus il a tendance à capter des électrons, plus il est capable d'oxyder un autre couple, c'est à dire plus il est oxydant.

Soient deux couples :



Si E<sub>o2</sub> < E<sub>o1</sub>, le système (2) réduit le système 1 ; la réaction a alors lieu de gauche à droite.

Le système (2) est oxydé ; le système (1) est réduit.

En général, en biochimie, n est égal à 2.



## Énoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

### Rappels mathématiques

#### Exercice 1 Déterminer $\alpha$ , $\alpha'$ et $\alpha''$ dans les cas suivants

$$\begin{array}{lll}
 10000 = 10^\alpha & 456788987 = 45,6788987 \cdot 10^\alpha & 0,001 = 10^\alpha \\
 0,0000045 = 45 \cdot 10^\alpha = 4,5 \cdot 10^{\alpha'} = 4500 \cdot 10^{\alpha''} & & 0,025 = 2,5 \cdot 10^\alpha = 25 \cdot 10^{\alpha'}
 \end{array}$$

#### Exercice 2 Ecrire sous forme décimale

$$10^0 \qquad 10^5 \qquad 10^{-2} \qquad 2,35 \cdot 10^{-3} \qquad 0,5 \cdot 10^{-3}$$

#### Exercice 3 Résoudre les systèmes

$$x^2 + 4 \cdot x - 2 = 0 \qquad x^2 + 0,003 \cdot x + 5 \cdot 10^{-8} = 0$$

### Grandeurs et unités

#### Exercice 4 Ecrire en utilisant les puissances de 10 (1 unité avec ses décimales et une puissance de 10)

|                   |                   |                  |                  |
|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| En m :            | 25 $\mu\text{m}$  | 350 nm           | 300000 km        |
| En kg :           | 20 $\mu\text{g}$  | 150 g            | 1000000 g        |
| En mg :           | 100 $\mu\text{g}$ | 200 g            | 0,00030 kg       |
| En $\text{m}^3$ : | 20 mL             | 50 $\mu\text{L}$ | 2000000 L        |
| En L :            | 50 $\mu\text{L}$  | 200 mL           | 300 $\text{m}^3$ |

### Expression de la concentration de solutions

#### Exercice 5 Expression de la concentration molaire " C "

Exprimer, en  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , la concentration des solutions suivantes :

- glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) à 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ;
- albumine ( $69000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ou 69000 Da) à 60  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  ;
- urée ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) à 29  $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ .

#### Exercice 6 Expression de la concentration massique " $\rho$ "

Exprimer, en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la concentration des solutions suivantes :

- glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) à 5,55  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;
- chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$ ) à 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;
- carbonate de potassium et de sodium ( $\text{NaKCO}_3$ ) à 0,15  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### Exercice 7 Calcul de la pression osmotique (osmolarité) exercée par diverses solutions

Calculer, en mosmol, les pressions osmotiques exercées, à 25°C, par les solutions suivantes :

- glucose à 1,00  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ;
- chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) à 9,00  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ;
- chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$ ) à 10,1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ;
- urée ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) à 0,200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Exercice 8** Calcul de la concentration massique " $\rho$ " et de la concentration des charges positives connaissant la force ionique

La force ionique d'une solution de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) est de  $0,530 \text{ mol.L}^{-1}$ .

1. Calculer la concentration massique en chlorure de calcium.
2. Quelle est la concentration, en  $\text{mmol.L}^{-1}$ , des charges positives apportées par le chlorure de calcium dans cette solution ?

**Préparation de solutions étalons et autres****Exercice 9** Préparation de 100 mL d'une solution de chlorure de sodium à  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ 

Préciser la préparation de 100 mL de solution de chlorure de sodium à  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$  à partir de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) solide ( $M = 58,44 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

**Exercice 10** Préparation d'un litre de solution de lessive de soude à 30 %

Préciser la préparation d'un litre de solution de lessive de soude ( $\text{NaOH}$ ) à 30 % à partir de pastilles de soude.

**Exercice 11** Préparation d'une solution d'acide chlorhydrique à environ  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ 

A partir d'une solution commerciale d'acide chlorhydrique, préparer 1 litre de la solution d'acide chlorhydrique désirée.

Pour la solution commerciale d'acide chlorhydrique, il est indiqué sur le flacon : -  $M_{\text{HCl}} = 36,46 \text{ g.mol}^{-1}$  ;  
 -  $\rho = 1,17 - 1,18 \text{ g.mL}^{-1}$  ;  
 - pureté 35 % à 37 % minimum.

**Exercice 12** Préparation d'une solution étalon d'hydrogénophthalate de potassium et étalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium

Les solutions d'hydroxyde de sodium doivent être systématiquement étalonnées si l'on a besoin d'en connaître exactement la concentration molaire.

1. Expliquer les raisons de la nécessité de cet étalonnage.
2. D'une manière générale, l'étalonnage de solutions peut être effectué selon deux méthodologies :
  - la pesée directe : une masse de produit est pesée, dissoute, introduite dans un vase à réaction et mise en contact avec le réactif antagoniste jusqu'à équivalence ;
  - la pesée indirecte : une masse de produit (nécessairement différente de la précédente) est pesée, dissoute dans un volume connu (fiolle jaugée) ; une prise d'essai est alors introduite dans un vase à réaction et mise en contact avec le réactif antagoniste jusqu'à équivalence.

Indiquer sous forme de tableau les avantages et les limites de chacune de ces méthodes.

3. L'objectif est d'étalonner une solution d'hydroxyde de sodium à environ  $0,330 \text{ mol.L}^{-1}$ .
  - 3.1. Après avoir rappelé la réaction chimique se produisant, calculer la masse d'hydrogénophthalate de potassium ( $M = 204,2 \text{ g.mol}^{-1}$ ) à peser pour obtenir une chute de burette de  $\text{NaOH}$  d'environ 15 mL.
  - 3.2. En fait, on dispose au laboratoire d'une solution d'hydrogénophthalate de précision suffisante pour servir de solution d'étalonnage. Cette solution a une concentration exacte de  $15,8675 \text{ g.L}^{-1}$ . Quelle prise d'essai suggérer pour obtenir une chute de burette d'environ 15 mL ? Quel indicateur proposer ici ?

**Exercice 13** Etalonnage d'une solution de  $\text{HCl}$  par pesées directes de carbonate de sodium

1. Mode opératoire : (2 essais)
  - peser précisément (à 0,1 mg près), une masse voisine de 0,15 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $M = 106 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ;
  - dissoudre, en fiolle d'Erlenmeyer, dans un volume d'eau distillée voisin de 30 mL ;
  - ajouter quelques gouttes d'hélianthine ;
  - verser, à la burette, la solution d' $\text{HCl}$  à étalonner jusqu'au virage de l'indicateur coloré ;
  - noter le volume (en mL) de chute de burette.

## 2. Questions

- 2.1. Présenter les équations du dosage.
- 2.2. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique. Calculer cette concentration molaire pour chacun des essais à l'aide des résultats expérimentaux suivants :

| Carbonate de sodium<br>(en g) | Acide chlorhydrique<br>(en mL) |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 0,1518                        | 9,90                           |
| 0,1609                        | 10,45                          |

2.3. Conclure sachant que le pourcentage d'écart maximal admissible entre deux valeurs expérimentales est de 1 % pour cette technique.

#### **Exercice 14** Etalonnage d'une solution de $\text{H}_2\text{SO}_4$ par pesées indirectes d'hydrogénocarbonate de potassium

##### 1. Mode opératoire

- préparer 100 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de potassium par pesée d'une masse voisine de 0,15 g d'hydrogénocarbonate de potassium anhydre ( $\text{KHCO}_3$ ,  $M = 100,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ );
- dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, introduire :
  - solution étalon d'hydrogénocarbonate de potassium ..... 10 mL.
  - eau distillée ..... 20 mL.
  - indicateur coloré, hélianthine ..... 2 gouttes
- doser par la solution d'acide sulfurique à étalonner jusqu'au virage de l'indicateur.

##### 2. Questions

- 2.1. Présenter les équations du dosage.
- 2.2. Établir la formule littérale nécessaire au calcul de la concentration molaire de la solution d'acide sulfurique. Calculer cette concentration molaire pour chacun des essais à l'aide des résultats expérimentaux suivants :

| Hydrogénocarbonate de potassium<br>(en g) | Acide sulfurique<br>(en mL) |
|-------------------------------------------|-----------------------------|
| 0,4025                                    | 10,05                       |
| 0,4165                                    | 10,55                       |

2.3. Conclure sachant que le pourcentage d'écart maximal admissible entre deux valeurs expérimentales est de 2 % pour cette technique.

#### **Exercice 15** Titrage d'une solution d'acide chlorhydrique par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire connue

Une solution d'hydroxyde de sodium à  $0,124 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  est utilisée pour titrer une solution d'acide chlorhydrique. 20 mL de solution d'acide chlorhydrique à titrer sont introduits dans un vase de réaction. La solution d'hydroxyde de sodium est introduite dans une burette puis ajoutée goutte à goutte dans le vase de réaction. 12,65 mL de solution d'hydroxyde de sodium sont introduits pour obtenir l'équivalence.

1. Calculer la concentration de la solution d'hydroxyde de sodium. Quel indicateur de fin de réaction peut-on utiliser ?
2. Quel serait le volume équivalent obtenu si 20 mL de solution d'hydroxyde de sodium avaient été introduits dans le vase de réaction et titrés par la solution d'acide chlorhydrique ? Quel indicateur de fin de réaction pourrait-on utiliser ?

#### **Exercice 16** Préparation d'une solution étalon d'acide oxalique et étalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium

0,4024 g d'acide oxalique ( $M = 126,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sont pesés pour confectionner 100 mL de solution étalon d'acide oxalique. Cette solution sera utilisée pour étalonner une solution d'hydroxyde de sodium à environ  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

1. Écrire les équations de réaction entre l'hydroxyde de sodium et l'acide oxalique en solution.
2. La détermination du volume équivalent, pour l'étalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium, peut être réalisée selon les trois méthodologies suivantes : volumétrie, pH-métrie et conductimétrie. Décrire brièvement ces trois méthodologies.
3. De quels matériels, produits et réactifs a-t-on besoin :
  - pour préparer la solution étalon ;
  - pour réaliser l'étalonnage en précisant les matériels, produits et réactifs (communs et spécifiques) à chaque méthodologie susceptible d'être mise en oeuvre ?
4. Calculer la concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium, sachant qu'une prise d'essai de 20 mL de solution d'acide oxalique est introduite dans le vase de réaction et que l'équivalence est obtenue pour 12,05 mL d'hydroxyde de sodium.

#### **Exercice 17** Phosphore et phosphates dans le sérum et l'urine

Le phosphore des milieux biologiques, tels que sérum et urine, est sous forme de sels de l'acide orthophosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , triacide ayant comme  $\text{pK}_a$  1,92 ; 6,82 et 11,7.

1. Ecrire les trois couples acide-base présents lors des dissociations acide de l'acide orthophosphorique ; nommer les diverses formes ioniques ; indiquer, en fonction du pH, quelles sont les formes majoritaires.

2. Applications.

2.1. Sachant que le sérum a un pH de 7,35 et l'urine un pH voisin de 6 :

- indiquer les formes ioniques prédominantes présentes à ces pH ;
- représenter la courbe donnant le pourcentage des diverses formes ioniques en fonction du pH.

2.2. Sachant que la phosphorémie (concentration du phosphore dans le sérum) est de  $1,00 \text{ mmol.L}^{-1}$ , calculer la concentration des différentes formes ioniques présentes dans ce sérum de  $\text{pH} = 7,35$ .

### **Exercice 18** Courbe de titrage d'une solution d'acide acétique par une monobase forte

50 mL de solution  $0,200 \text{ mol.L}^{-1}$  d'acide acétique ( $\text{pK}_a = 4,75$ ) sont introduits dans un vase de réaction dans lequel plongent une électrode indicatrice sensible à la concentration des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  et une électrode de référence. Ces électrodes sont reliées à un pH-mètre. On étudie les variations de pH en fonction d'ajouts de solution d'hydroxyde de sodium  $0,250 \text{ mol.L}^{-1}$ .

1. Calculer le volume équivalent.

2. Calculer le pH de la solution pour les volumes d'hydroxyde de sodium correspondant à :

- un volume nul d'hydroxyde de sodium ;
- la demi équivalence ;
- l'équivalence ;
- un volume égal à deux fois le volume équivalent.

3. Donner l'allure de la courbe de titrage de la solution d'acide acétique dans les conditions précédentes.

### **Exercice 19** Préparation d'un tampon phosphate $\text{pH} = 7,00$ ( $\text{pK}_a$ à considérer : 6,82) à $0,500 \text{ mol.L}^{-1}$

Préciser la préparation d'un litre de tampon phosphate  $\text{pH} = 7,00$  à  $0,500 \text{ mol.L}^{-1}$  à partir :

- de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solide ( $M = 136,09 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ;
- de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  solide ( $M = 174,18 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

### **Exercice 20** Préparation d'un tampon acétate $\text{pH} = 4,75$ ( $\text{pK}_a = 4,75$ ) à $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$

Préciser la préparation d'un litre de tampon acétate  $\text{pH} = 4,75$  à  $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$  à partir :

- d'acide acétique ( $M = 60,07 \text{ g.mol}^{-1}$  ; pureté 100 % ;  $d = 1,05$ ) ;
- d'acétate de sodium solide ( $M = 82,03 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

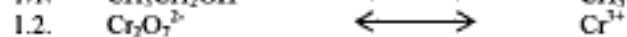
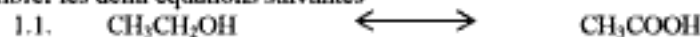
### **Exercice 21** Préparation d'un tampon glycine $\text{pH} = 9,00$ ( $\text{pK}_a$ à considérer : 9,60) à $1,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Préciser la préparation de 500 mL de tampon glycine  $\text{pH} = 9,00$  à  $1,20 \text{ mol.L}^{-1}$  à partir :

- de glycine (isoélectrique) ( $M = 75,00 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ;
- d'une solution de  $\text{NaOH}$  à  $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$  ;
- d'une solution d' $\text{HCl}$  à  $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ .

### **Exercice 22** Equations d'oxydo-réduction

1. Equilibrer les demi équations suivantes



2. Ecrire les équations bilans des demi équations 1 et 2 ; 2 et 3 ; 4 et 5.

### **Exercice 23** Etalonnage d'une solution de $\text{KMnO}_4$ par pesée directe d'oxalate de sodium anhydre ( $\text{CO}_2 / \text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ )

1. Ecrire les réactions mises en jeu dans cet étalonnage.

2. Calculer la concentration molaire de la solution de permanganate de potassium sachant que l'on a pesé  $0,0989 \text{ g}$  d'oxalate de sodium et que l'on a obtenu une chute de burette de  $14,25 \text{ mL}$  de permanganate de potassium.

**Exercice 24** Potentiels standard en biochimie

La cellule animale récupère efficacement de l'énergie suite à un transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les donneurs d'électrons sont des métabolites comme le succinate, l'accepteur final est le dioxygène, le transfert s'effectuant par l'intervention de différents intermédiaires.

Deux de ces intermédiaires, dans le cas du succinate, sont la flavine adénine dinucléotide (FAD) et le cytochrome b (cyt b). Le FAD intervient en amont par rapport au cytochrome b.

Les potentiels standard biochimiques des couples redox sont :

$$E'_{o_1} (\text{FAD}/\text{FADH}_2) = -0,06 \text{ V} \quad \text{et} \quad E'_{o_2} (\text{cyt b Fe}^{3+}/\text{cyt b Fe}^{2+}) = +0,04 \text{ V}$$

1. Ecrire les deux demi équations des couples redox considérés. La position en amont du FAD par rapport au cytochrome b se justifie-t-elle au regard des potentiels standard biochimiques ?
2. Calculer les potentiels standard chimiques  $E_o$  des deux couples redox précédents. Conclure quant à l'intérêt de l'utilisation des potentiels standard biochimiques par rapport aux potentiels standard chimiques.

## Corrigé des exercices

### Rappels mathématiques

#### Exercice 1 Détermination des coefficients $\alpha$ , $\alpha'$ et $\alpha''$

$$\begin{array}{lll} 10000 = 10^4 & 456788987 = 45,6788987 \cdot 10^7 & 0,001 = 10^{-3} \\ 0,0000045 = 45 \cdot 10^{-7} = 4,5 \cdot 10^{-6} = 4500 \cdot 10^{-9} & & 0,025 = 2,5 \cdot 10^{-2} = 25 \cdot 10^{-3} \end{array}$$

#### Exercice 2 Ecriture sous forme décimale

$$\begin{array}{llll} 10^0 = 1 & 10^5 = 100000 & 10^{-2} = 0,01 & 2,35 \cdot 10^{-3} = 0,00235 \\ 0,5 \cdot 10^{-3} = 0,0005 & & & \end{array}$$

#### Exercice 3 Résoudre les systèmes

$$\begin{array}{l} x^2 + 4x - 2 = 0, \quad b^2 - 4ac = 16 + 8 = 24 \text{ d'où } x = \frac{-4 \pm \sqrt{24}}{2} \Leftrightarrow x_1 = -4,45 \text{ et } x_2 = 0,449 \\ x^2 + 0,003x + 5 \cdot 10^{-8} = 0, \quad b^2 - 4ac = 9 \cdot 10^{-6} - 20 \cdot 10^{-8} = 8,8 \cdot 10^{-6} \text{ d'où } x = \frac{-0,003 \pm \sqrt{8,8 \cdot 10^{-6}}}{2} \\ \Leftrightarrow x_1 = -2,98 \cdot 10^{-3} \text{ et } x_2 = -1,68 \cdot 10^{-5} \end{array}$$

### Grandeurs et unités

#### Exercice 4 Ecriture en utilisant les puissances de 10 (1 unité avec ses décimales et une puissance de 10)

|                                |                                                  |                                                  |                                                 |
|--------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Expression en m :              | 25 $\mu\text{m} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$   | 350 nm = 3,5 $\cdot 10^{-7} \text{ m}$           | 300000 km = 3,0 $\cdot 10^8 \text{ m}$          |
| Expression en kg :             | 20 $\mu\text{g} = 2,0 \cdot 10^{-8} \text{ kg}$  | 150 g = 1,5 $\cdot 10^{-1} \text{ kg}$           | 1000000 g = 1,0 $\cdot 10^3 \text{ kg}$         |
| Expression en mg :             | 100 $\mu\text{g} = 1,0 \cdot 10^{-1} \text{ mg}$ | 200 g = 2,0 $\cdot 10^5 \text{ mg}$              | 0,00030 kg = 3,0 $\cdot 10^2 \text{ mg}$        |
| Expression en m <sup>3</sup> : | 20 mL = 2,0 $\cdot 10^{-5} \text{ m}^3$          | 50 $\mu\text{L} = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$ | 2000000 L = 2,0 $\cdot 10^3 \text{ m}^3$        |
| Expression en L :              | 50 $\mu\text{L} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ L}$   | 200 mL = 2,0 $\cdot 10^{-1} \text{ L}$           | 300 m <sup>3</sup> = 3,0 $\cdot 10^3 \text{ L}$ |

### Expression de la concentration de solutions

Dans les exercices qui suivent les concentrations molaires " $C$ " sont exprimées en mol.L<sup>-1</sup>, les volumes " $V$ " en L, les masses " $m$ " en g, les masses molaires atomiques et moléculaires " $M$ " en g.mol<sup>-1</sup>.

#### Exercice 5 Expression de la concentration molaire " $C$ "

La concentration molaire d'une solution " $C$ " s'obtient en rapportant, dans un système d'unités concordant, la concentration massique " $\rho$ " de la solution à la masse molaire moléculaire " $M$ " du soluté en solution :

$$C = \frac{\rho}{M}$$

Les applications numériques sont :

- solution de glucose à 5 mg.mL<sup>-1</sup> soit 5 g.L<sup>-1</sup> :  $C_{\text{glucose}} = \frac{5}{180,18} = 2,78 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$

- solution d'albumine à 60  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  soit 60 g.L<sup>-1</sup> :  $C_{\text{albumine}} = \frac{60}{69000} = 8,70 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

- solution d'urée à 29 g.m<sup>-3</sup> soit 29.10<sup>-3</sup> g.L<sup>-1</sup> :  $C_{\text{urée}} = \frac{29 \cdot 10^{-3}}{60,07} = 4,83 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

**Exercice 6** Expression de la concentration massique "  $\rho$  "

La concentration massique "  $\rho$  " d'une solution s'obtient en multipliant, dans un système d'unités concordant, la concentration molaire "  $C$  " de la solution par la masse molaire moléculaire "  $M$  " du soluté en solution :  $\rho = C \cdot M$

Les applications numériques sont :

- solution de glucose à  $5,55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  soit  $5,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  :

$$\rho_{\text{glucose}} = 5,55 \cdot 10^{-3} \cdot 180,18 = 1,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

- solution chlorure de magnésium à  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  soit  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  :

$$\rho_{\text{MgCl}_2} = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 203,33 = 10,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

- solution carbonate de potassium et de sodium à  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  :

$$\rho_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0,15 \cdot 122,10 = 18,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

**Exercice 7** Calcul de la pression osmotique (osmolarité) exercée par diverses solutions

L'osmolarité d'une solution s'obtient en multipliant la concentration molaire "  $C$  " de la solution par le nombre de particules "  $p$  " présentes suite à la dissolution du soluté :  $\text{Osmolarité} = C \cdot p$

- Le glucose et l'urée sont des molécules non dissociées en solution. Le nombre de particules présentes, suite à la dissolution du soluté, est égal à 1 ( $p = 1$ ).

- Le chlorure de sodium se dissocie, en solution, en 1 anion ( $\text{Cl}^-$ ) et 1 cation ( $\text{Na}^+$ ). Le nombre de particules présentes, suite à la dissolution du soluté, est égal à 2 ( $p = 2$ ).

- Le chlorure de magnésium se dissocie, en solution, en 2 anions (2  $\text{Cl}^-$ ) et 1 cation ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Le nombre de particules présentes, suite à la dissolution du soluté, est égal à 3 ( $p = 3$ ).

|                       | $\rho$ en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | $M$ en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $C$ en $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Osmolarité en $\text{mosm} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|-----------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Glucose               | 1,00                                     | 180,18                                  | 5,55                                     | 5,55                                            |
| Chlorure de sodium    | 9,00                                     | 58,44                                   | 154                                      | 308                                             |
| Chlorure de magnésium | 10,1                                     | 203,33                                  | 49,7                                     | 149                                             |
| Urée                  | $0,200 \cdot 10^{-3}$                    | 60,07                                   | $3,33 \cdot 10^{-3}$                     | $3,33 \cdot 10^{-3}$                            |

**Exercice 8** Calcul de la concentration massique "  $\rho$  " et de la concentration des charges positives connaissant la force ionique

La force ionique d'une solution est donnée par la relation :

$$I = \mu = \frac{1}{2} \cdot \sum C_i \cdot z_i^2$$

Dans cette relation,  $C_i$  représente la concentration molaire de l'espèce ionique "  $i$  " et "  $z_i$  " la charge de l'espèce ionique "  $i$  ".

1. Le chlorure de calcium se dissocie, en solution, en 2 anions (2  $\text{Cl}^-$ ) et 1 cation ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sa force ionique se calcule comme suit :

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \left[ (C_{\text{CaCl}_2} \cdot 2 \cdot 1^2) + (C_{\text{CaCl}_2} \cdot 2^2) \right]$$

De cette relation, on extrait la concentration molaire en chlorure de calcium de la solution :

$$C_{\text{CaCl}_2} = \frac{\mu \cdot 2}{(2 \cdot 1^2) + (2^2)} \text{ soit } C_{\text{CaCl}_2} = \frac{0,530 \cdot 2}{(2 \cdot 1^2) + (2^2)} = 0,177 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Ce qui permet de calculer la concentration massique en chlorure de calcium de la solution :

$$\rho_{\text{CaCl}_2} = 0,177 \cdot 110,98 = 19,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

2. La concentration des charges positives est égale à 2 fois celle des ions calcium, c'est-à-dire à  $2 \cdot 0,177 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 0,354 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  soit  $354 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Préparation de solutions étalons et autres****Exercice 9** Préparation de 100 mL d'une solution de chlorure de sodium à  $0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 

La concentration molaire d'une solution s'obtient en rapportant, dans un système d'unités concordant, la concentration massique de la solution à la masse molaire moléculaire du soluté en solution. Or, la concentration massique d'une solution est par définition la masse du soluté ramenée au volume de solution préparée ( $V_{\text{sp}}$ ). Il est alors possible d'écrire la formule littérale suivante :  $C = \frac{m}{V_{\text{sp}} \cdot M}$

De cette relation, on extrait la masse de chlorure de sodium à peser pour la préparation de la solution :  $m = C \cdot V_{\text{sp}} \cdot M$ ,

$$\text{soit } m = 0,100 \cdot 100 \cdot 10^{-3} \cdot 58,44 = 0,5844 \text{ g}$$

Mode opératoire :

- peser exactement 0,5844 g de chlorure de sodium et les dissoudre dans un volume minimum d'eau distillée ;
- transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### Exercice 10 Préparation d'un litre de solution de lessive de soude à 30 %

La concentration souhaitée de la solution de lessive de soude (hydroxyde de sodium - NaOH) est de 30 % soit 30 g pour 100 mL ou encore 300 g.L<sup>-1</sup>. Il faut donc peser 300 g de pastilles de soude pour préparer 1 litre de lessive de soude.

Mode opératoire :

- introduire dans un bécher environ 400 mL d'eau distillée et y verser petit à petit les 300 g de pastilles d'hydroxyde de sodium (caustique !) ;
- agiter et refroidir sous l'eau courante ;
- transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### Exercice 11 Préparation d'une solution d'acide chlorhydrique à environ 0,2 mol.L<sup>-1</sup>

La quantité de matière " n<sub>2</sub> " présente dans la solution préparée est identique à la quantité de matière " n<sub>1</sub> " apportée par la solution commerciale.

$$\begin{aligned} n_1 &= n_2 \\ \Leftrightarrow C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ \Leftrightarrow V_1 &= \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} \end{aligned}$$

Il faut déterminer C<sub>1</sub>, concentration molaire de la solution commerciale d'acide chlorhydrique

$$C_1 = \frac{\rho \cdot 10^3 \cdot P}{M}$$

avec :  $\rho$  = masse volumique de la solution commerciale d'acide chlorhydrique en g.mL<sup>-1</sup>  
 ( $\rho$  exprimé en g.mL<sup>-1</sup> est numériquement égal à la densité de la solution commerciale d'acide chlorhydrique)  
 P = pureté de la solution en %  
 M = masse molaire moléculaire de l'acide chlorhydrique

$$\text{d'où } V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2 \cdot M}{\rho \cdot 10^3 \cdot P} \quad \text{soit} \quad V_1 = \frac{0,2 \cdot 1 \cdot 36,46}{1,17 \cdot 10^3 \cdot 0,35} = 1,78 \cdot 10^{-2} \text{ L}$$

Pour préparer 1 L d'une solution d'acide chlorhydrique à environ 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, il faut introduire environ 18 mL de solution commerciale d'acide chlorhydrique dans une fiole de 1 L et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### Exercice 12 Préparation d'une solution étalon d'hydrogénophthalate de potassium et étalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium

1. Nécessité d'un étalonnage des solutions d'hydroxyde de sodium :

- impossibilité de réaliser des solutions de concentration connue avec précision, du fait de l'hydratation spontanée des pastilles de soude ;
- carbonatation avec le temps des solutions d'hydroxyde de sodium.

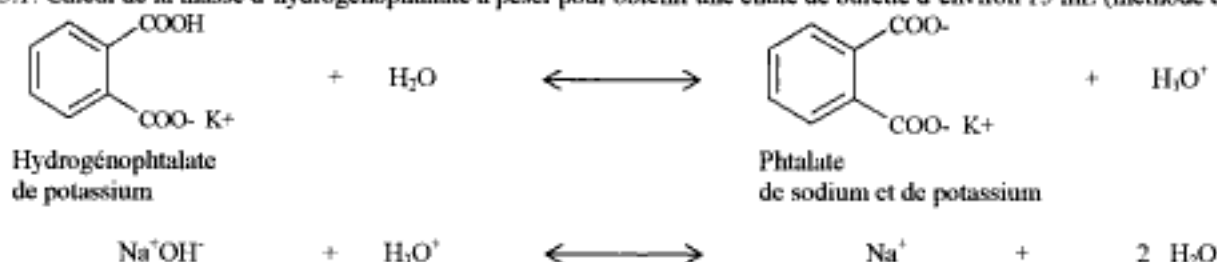
2. Avantages et limites des deux méthodes

|                   | Avantages                                           | Limites                                                                   |
|-------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Méthode directe   | - rapidité<br>- bonne précision et bonne exactitude | - peut conduire à une pesée trop faible pour obtenir une bonne exactitude |
| Méthode indirecte | - toujours utilisable                               | - plus long<br>- précision plus faible                                    |



3. Etalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium à environ  $0,330 \text{ mol.L}^{-1}$ 

3.1. Calcul de la masse d'hydrogénophthalate à peser pour obtenir une chute de burette d'environ 15 mL (méthode directe)



A l'équivalence, le nombre de moles "n" d'ions hydronium cédés par l'acide (hydrogénophthalate de potassium) est égal au nombre de moles "n'" d'ions hydronium acceptés par la base (hydroxyde de sodium).

$$n = n'$$

$$\Leftrightarrow \frac{m}{M} \cdot 1 = C' \cdot V' \cdot 1$$

$$\Leftrightarrow m = C' \cdot V' \cdot M$$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $m = 0,330 \cdot 15 \cdot 10^{-3} \cdot 204,22 = 1,0109 \text{ g}$

NB : La masse à peser (1,0109 g) est supérieure à 100 mg, l'utilisation d'une balance analytique (pesant à 0,0001 g près) permettra une pesée précise.

3.2. Calcul de la prise d'essai de solution d'hydrogénophthalate de potassium à  $15,8675 \text{ g.L}^{-1}$  à peser pour obtenir une chute de burette voisine de 15 mL d'hydroxyde de sodium environ  $0,330 \text{ mol.L}^{-1}$ .

A l'équivalence, le nombre de moles "n" d'ions hydronium cédés par l'acide (hydrogénophthalate de potassium) est égal au nombre de moles "n'" d'ions hydronium acceptés par la base (hydroxyde de sodium).

$$n = n'$$

$$\Leftrightarrow \frac{\rho}{M} \cdot V \cdot 1 = C' \cdot V' \cdot 1$$

$$\Leftrightarrow V = C' \cdot V' \cdot \frac{M}{\rho}$$

L'application numérique donne le résultat suivant :

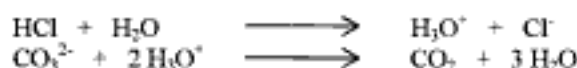
$$V = 0,330 \cdot 15 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{204,22}{15,8675} = 6,371 \cdot 10^{-2} \text{ L soit } 63,71 \text{ mL}$$

Un tel volume de prise d'essai (voisin de 60 mL) est peu conventionnel pour un étalonnage volumétrique. La solution d'hydrogénophthalate n'est donc pas très bien adaptée à l'étalonnage de solution de NaOH à environ  $0,330 \text{ mol.L}^{-1}$  et pour une chute de burette désirée voisine de 15 mL.

La phénol-phthaléine pourrait être utilisée comme indicateur de fin de réaction.

**Exercice 13** Etalonnage d'une solution de HCl par pesées directes de carbonate de sodium

## 2.1. Equations de dosage



## 2.2. Calcul de la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique

A l'équivalence, le nombre de moles "n" d'ions hydronium cédés par l'acide (HCl) est égal au nombre de moles "n'" d'ions hydronium acceptés par la base (carbonate de sodium).

$$n = n'$$

$$\Leftrightarrow C \cdot V \cdot 1 = \frac{m'}{M'} \cdot 2$$

$$\Leftrightarrow C = \frac{m' \cdot 2}{M' \cdot V}$$

Les applications numériques donnent les résultats suivants :

$$C_1 = \frac{0,1518 \cdot 2}{9,90 \cdot 10^{-3} \cdot 106} = 0,2893 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$C_2 = \frac{0,1609 \cdot 2}{10,45 \cdot 10^{-3} \cdot 106} = 0,2905 \text{ mol.L}^{-1}$$

## 2.3. Conclusion

- Calcul du pourcentage d'écart " E " entre les deux valeurs expérimentales  $E = \left| \frac{0,2893 - 0,2905}{\frac{0,2893 + 0,2905}{2}} \right| \cdot 100 = 0,41 \%$

- Le pourcentage d'écart entre les deux valeurs expérimentales est inférieur à 1 %, la moyenne des deux valeurs expérimentales peut être calculée, soit  $0,2899 \text{ mol.L}^{-1}$ .

**Exercice 14 Etalonnage d'une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  par pesées indirectes d'hydrogénocarbonate de potassium**

## 2.1. Equations de dosage



## 2.2. Calcul de la concentration molaire de la solution d'acide sulfurique

A l'équivalence, le nombre de moles " n " d'ions hydronium cédés par l'acide ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) est égal au nombre de moles " n' " d'ions hydronium acceptés par la base (hydrogénocarbonate de potassium).

$$\begin{array}{l} n = n' \\ \Leftrightarrow C \cdot V \cdot 2 = C' \cdot V' \cdot 1 \end{array}$$

or 
$$C = \frac{m'}{V_{sp} \cdot M'}$$

avec :  $m'$  = masse d'hydrogénocarbonate de potassium pesée  
 $V_{sp}$  = Volume de solution d'hydrogénocarbonate de potassium préparée  
 $M'$  = masse molaire moléculaire de l'hydrogénocarbonate de potassium

d'où 
$$C = \frac{m' \cdot V'}{V_{sp} \cdot M' \cdot V \cdot 2}$$

Les applications numériques donnent les résultats suivants :

$$C_1 = \frac{0,4025 \cdot 10 \cdot 10^{-3}}{100 \cdot 10^{-3} \cdot 1001 \cdot 10,05 \cdot 10^{-3} \cdot 2} = 0,02000 \text{ mol.L}^{-1} \quad C_2 = \frac{0,4165 \cdot 10 \cdot 10^{-3}}{100 \cdot 10^{-3} \cdot 1001 \cdot 10,55 \cdot 10^{-3} \cdot 2} = 0,01972 \text{ mol.L}^{-1}$$

## 2.3. Conclusion

- Calcul du pourcentage d'écart « E » entre les deux valeurs expérimentales  $E = \left| \frac{0,02000 - 0,01972}{\frac{0,02000 + 0,01972}{2}} \right| \cdot 100 = 1,4 \%$

- Le pourcentage d'écart entre les deux valeurs expérimentales est inférieur à 2 %, la moyenne des deux valeurs expérimentales peut être calculée, soit  $0,01986 \text{ mol.L}^{-1}$ .

**Exercice 15 Titrage d'une solution d'acide chlorhydrique par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire connue**

## 1. Calcul de la concentration de la solution d'hydroxyde de sodium



A l'équivalence, le nombre de moles " n " d'ions hydronium cédés par l'acide (acide chlorhydrique) est égal au nombre de moles " n' " d'ions hydronium acceptés par la base (hydroxyde de sodium).

$$\begin{array}{l} n = n' \\ \Leftrightarrow C \cdot V \cdot 1 = C' \cdot V' \cdot 1 \end{array}$$

$$\Leftrightarrow C = \frac{C' \cdot V'}{V}$$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $C = \frac{0,124 \cdot 12,65 \cdot 10^{-3}}{20,00 \cdot 10^{-3}} = 0,0784 \text{ mol.L}^{-1}$

L'indicateur utilisé peut être la phénolphtaléine qui passe de l'incolore au rose à pH supérieur à 8.

## 2. Calcul du volume équivalent d'acide chlorhydrique

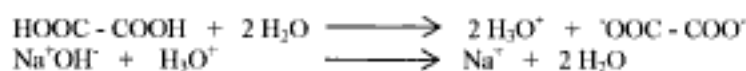
Selon le même raisonnement que précédemment, on peut écrire :  $V = \frac{C' \cdot V'}{C}$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $V = \frac{0,124 \cdot 20,00 \cdot 10^{-3}}{0,0784} = 3,163 \cdot 10^{-3} \text{ L}$  soit 31,63 mL.

L'indicateur utilisé peut être l'hélianthine.

**Exercice 16** Préparation d'une solution étalon d'acide oxalique et étalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium

## 1. Equations de réaction



## 2. Méthodologies susceptibles d'être mises en œuvre pour déterminer le volume équivalent

- Volumétrie : utilisation d'un indicateur coloré changeant de couleur lors du saut de pH.
- pH-métrie :
  - mesure du pH lors d'ajouts connus de la solution d'hydroxyde de sodium ;
  - réalisation du graphe  $\text{pH} = f(\text{volume hydroxyde de sodium})$  ;
  - détermination du volume équivalent au saut de pH par utilisation de la méthode des tangentes.
- Conductimétrie :
  - mesure du volume initial  $V_0$  (comprenant l'eau distillée éventuellement ajoutée) ;
  - mesure de la conductance  $C_d$  lors d'ajouts connus  $V$  de la solution d'hydroxyde de sodium ;
  - calcul des conductances corrigées  $C_{d_{\text{cor}}} = C_{d_{\text{bc}}} \cdot ((V_0 + V) / V_0)$  ;
  - réalisation du graphe  $C_{d_{\text{cor}}} = f(\text{volume hydroxyde de sodium})$  et détermination du volume équivalent.

## 3. Matériels et produits nécessaires

- Matériels et réactifs nécessaires pour préparer la solution étalon
  - Produits :
    - acide oxalique cristallisé, pur et sec ( $M = 126,08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) ;
    - eau distillée.
  - Matériels :
    - balance de laboratoire réalisant des pesées à 0,1 mg près ;
    - sabot de pesée ;
    - fiole jaugée de 100 mL ;
    - matériels pour ajustage du volume.
- Matériels et réactifs nécessaires pour réaliser l'étalonnage
  - Réactifs :
    - solution à étalonner d'hydroxyde de sodium ;
    - solution étalon d'acide oxalique ;
    - eau distillée (en pissette) ;
    - indicateur de fin de réaction (volumétrie).
  - Matériels :
    - Matériels communs aux trois méthodologies :**
      - vase de réaction ;
      - burette et support de burette.
    - Matériels spécifiques :**
      - au dosage volumétrique : le matériel commun suffit.
      - au dosage pH-métrique :
        - pH-mètre et ses électrodes (électrode indicatrice (verre) et électrode de référence (calomel) (ou une électrode combinée)) et les tampons d'étalonnage ;
        - dispositif d'agitation : barreau aimanté et agitateur magnétique.
      - au dosage conductimétrique :
        - conductimètre et sa cellule ;
        - dispositif d'agitation : barreau aimanté et agitateur magnétique.

## 4. Calcul de la concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium

A l'équivalence, le nombre de moles " n " d'ions hydronium cédés par l'acide (acide oxalique) est égal au nombre de moles " n' " d'ions hydronium acceptés par la base (hydroxyde de sodium).

$$\Leftrightarrow n = n'$$

$$\Leftrightarrow C \cdot V \cdot 2 = C' \cdot V' \cdot 1$$

$$\text{or } C = \frac{m}{V_{\text{sp}} \cdot M}$$

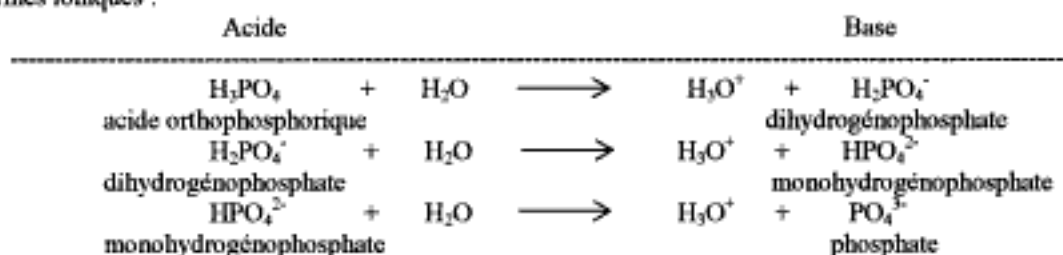
avec :  $m$  = masse d'acide oxalique pesée  
 $V_{\text{sp}}$  = volume de solution d'acide oxalique préparée  
 $M$  = masse molaire moléculaire de l'acide oxalique

$$\text{d'où } C = \frac{m \cdot V \cdot 2}{V_{\text{sp}} \cdot M \cdot V'}$$

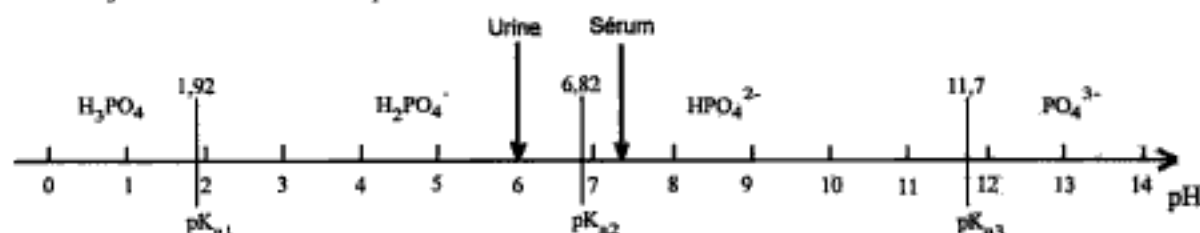
L'application numérique donne le résultat suivant :  $C = \frac{0,4024 \cdot 20,00 \cdot 10^{-3} \cdot 2}{100 \cdot 10^{-3} \cdot 126,08 \cdot 12,05 \cdot 10^{-3}} = 0,106 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

**Exercice 17 Phosphore et phosphates dans le sérum et l'urine****1. Dissociation de l'acide orthophosphorique**

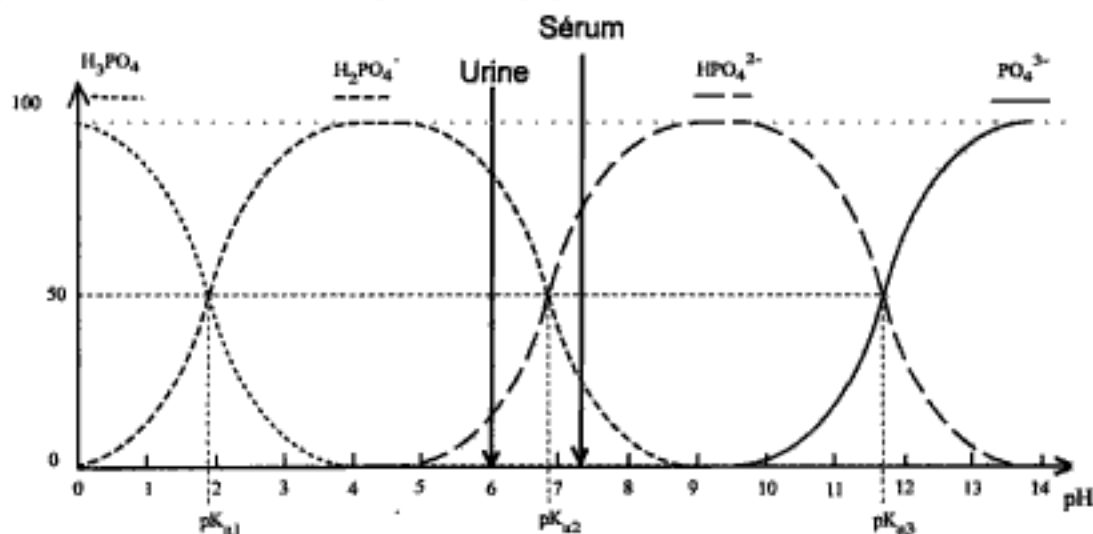
- Formes ioniques :



- Formes majoritaires en fonction du pH :

**2. Applications.**

2.1. Dans le sérum et l'urine, c'est le couple H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> / HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> qui est essentiellement présent. Le pH de ces deux milieux biologiques étant situés de part et d'autre du pK<sub>a</sub> du couple, c'est la forme acide (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) qui prédominera dans le milieu le plus acide (l'urine) et la forme basique (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) qui prédominera dans le milieu le plus basique (le sérum) :



2.2. Calcul de la concentration des différentes formes ioniques des phosphates dans un sérum à pH = 7,35.

Comme on l'a dit précédemment, les seules formes ioniques existant à concentration mesurable sont H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, acide et base conjugués.

Le pH d'un mélange d'acide et de sa base conjuguée est donné par la relation de Henderson - Hasselbalch :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

Soit  $x = [\text{HPO}_4^{2-}]$  et  $y = [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ , la relation précédente s'écrit alors :  $\text{pH} = 6,82 + \log (x / y)$

d'où  $\log (x / y) = 0,530$  et  $x / y = 3,39$ .

D'autre part, la somme des concentrations des deux formes est de 1,00 mmol.L<sup>-1</sup>.

On est donc ramené au système d'équations suivant,  $x$  et  $y$  étant exprimés en mmol.L<sup>-1</sup> :

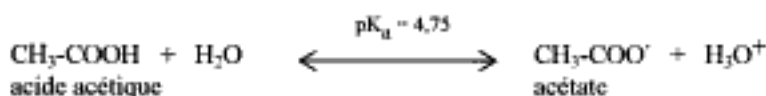
$$\begin{cases} x / y = 3,39 \\ x + y = 1,00 \end{cases}$$

$$\text{d'où } x = [\text{HPO}_4^{2-}] = 0,772 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ et } y = [\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,228 \text{ mmol.L}^{-1}$$

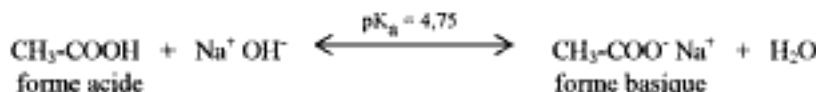
**Exercice 18** Courbe de titrage d'une solution d'acide acétique par une monobase forte

## 1. Calcul du volume équivalent

En solution aqueuse, l'acide acétique est faiblement dissocié :



Au fur et à mesure de l'ajout de solution d'hydroxyde de sodium à une solution d'acide acétique, il se forme de l'acétate de sodium :



Le volume équivalent ( $V_{eq}$ ) est le volume de réactif titrant, ici la solution d'hydroxyde de sodium, correspondant à la neutralisation de l'acide acétique. A l'équivalence, le nombre de moles "n" d'ions hydronium cédés par l'acide (acide acétique) est égal au nombre de moles "n'" d'ions hydronium acceptés par la base (hydroxyde de sodium).

$$\begin{aligned} n &= n' \\ \Leftrightarrow C \cdot V \cdot 1 &= C' \cdot V' \cdot 1 \\ \Leftrightarrow V' &= \frac{C \cdot V}{C'} \end{aligned}$$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $V_{eq} = V' = \frac{0,200 \cdot 50 \cdot 10^{-3}}{0,250} = 40 \cdot 10^{-3} \text{ L}$  soit 40 mL.

## 2. Calcul du pH en certains points particuliers

- Volume nul d'hydroxyde de sodium ( $V' = 0$ ) :

On est en présence d'une solution d'acide faible. Le pH est donné par la relation :  $\text{pH} = \frac{1}{2} \cdot (pK_a - \log C_{\text{acide acétique}})$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $\text{pH} = \frac{1}{2} \cdot (4,75 - \log 0,200) = 2,72$

- Volume  $V' = V_{eq} / 2$  :

A la demi équivalence, il y a autant de forme dissociée que de forme non dissociée. L'équation de Henderson-Hasselbalch montre que le pH est alors égal au  $pK_a$ .

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{[\text{acétate}]}{[\text{acide acétique}]} = pK_a = 4,75$$

- Volume  $V' = V_{eq}$  :

Au point équivalent, on est en présence d'une solution d'acétate de sodium, c'est-à-dire d'une base faible. Le pH est donné par la relation  $\text{pH} = \frac{1}{2} \cdot (pK_a + 14 + \log C_{\text{acétate de sodium}})$

La concentration en acétate de sodium est égale au nombre de moles d'acide acétique neutralisé ( $C \cdot V$ ) divisé par le volume à savoir  $(V + V_{eq})$ , d'où :

$$\text{pH} = \frac{1}{2} \cdot (pK_a + 14 + \log \frac{C \cdot V}{V + V_{eq}})$$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $\text{pH} = \frac{1}{2} \cdot (4,75 + 14 + \log \frac{0,200 \cdot 50 \cdot 10^{-3}}{50 \cdot 10^{-3} + 40 \cdot 10^{-3}}) = 8,90$

- Volume  $V' = 2 \cdot V_{eq}$  :

A deux fois le point d'équivalence, on est en présence d'une solution de base faible et de base forte. Le pH de la solution est déterminé par la relation :  $\text{pH} = 14 - \text{pOH}$  soit  $\text{pH} = 14 + \log [\text{OH}^-]$

La concentration en ions  $\text{OH}^-$  est calculée comme suit :  $C_{\text{OH}^-} = \frac{C' \cdot V_{eq}}{V + 2 \cdot V_{eq}}$

$$\text{D'où } \text{pH} = 14 + \log \frac{C' \cdot V_{eq}}{V + 2 \cdot V_{eq}}$$

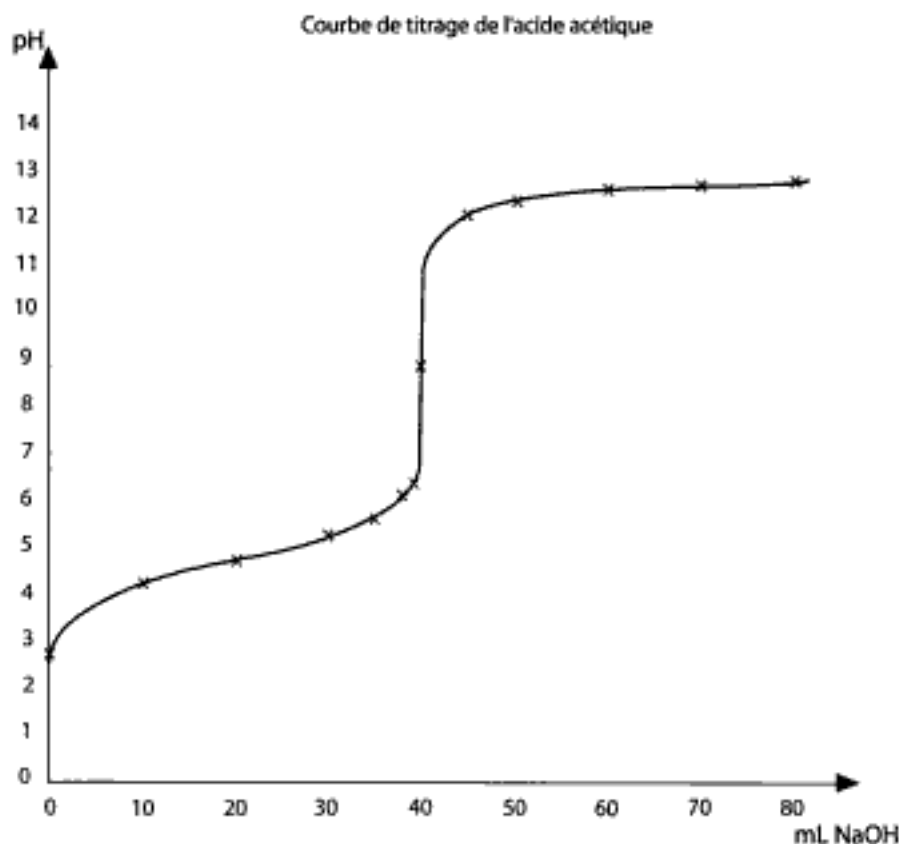
L'application numérique donne le résultat suivant :  $\text{pH} = 14 + \log \frac{0,250 \cdot 40 \cdot 10^{-3}}{50 \cdot 10^{-3} + 2 \cdot 40 \cdot 10^{-3}} = 12,89$

## 3. Courbe de titrage

L'allure de la courbe est donnée ci-après.

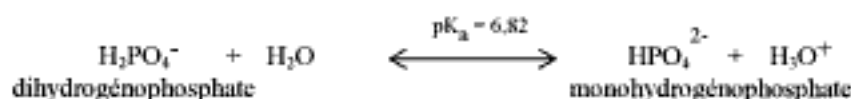
En fait, et bien que cela n'ait pas été demandé, cette courbe est la courbe réalisée en utilisant les valeurs de pH obtenues par application de l'équation de Henderson-Hasselbalch pour les points entre 0 et l'équivalence. Au delà de l'équivalence, le pH est calculé en considérant que l'on est en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium :  $(V' - 40)$  mL d'hydroxyde de sodium à  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$  dilués avec un volume final de  $(50 + V')$ . Les valeurs obtenues ont été les suivantes :

| NaOH à $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$<br>V' en mL | 0    | 10   | 20   | 30   | 35  | 38   | 39   | 40   | 45    | 50    | 60    | 70    | 80    |
|----------------------------------------------|------|------|------|------|-----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| pH                                           | 2,72 | 4,27 | 4,75 | 5,23 | 5,6 | 6,03 | 6,34 | 8,90 | 12,12 | 12,40 | 12,66 | 12,80 | 12,89 |



**Exercice 19** Préparation d'un litre de tampon phosphate pH = 7,00 ( $pK_a$  à considérer 6,82) à  $0,500 \text{ mol.L}^{-1}$

Les formes acide faible et base conjuguée du tampon phosphate pH = 7 sont respectivement  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ . L'équilibre à considérer dans ce tampon est :



Ici, on dispose de la forme acide et de la forme basique sous forme solide. La préparation du tampon consiste à dissoudre des masses de chacune de ces deux formes telles que les concentrations satisfassent à l'équation de Henderson - Hasselbalch :

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{acide}]}$$

avec ici comme forme acide, la forme  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et comme forme basique, la forme  $\text{HPO}_4^{2-}$  soit :

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

Dans le tampon exprimons la conservation de la quantité de matière :

$$[\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,500 \text{ mol.L}^{-1}$$

De ceci on déduit que :  $[\text{HPO}_4^{2-}] = 0,500 - [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$

L'expression du pH devient :  $\text{pH} = pK_a + \log \frac{0,500 - [\text{H}_2\text{PO}_4^-]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$  d'où  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = \frac{0,500}{1 + 10^{\text{pH} - pK_a}}$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $[H_2PO_4^-] = \frac{0,500}{1 + 10^{7,00-4,87}} = 0,199 \text{ mol.L}^{-1}$

$$\text{et } [HPO_4^{2-}] = 0,500 - 0,199 = 0,301 \text{ mol.L}^{-1}$$

NB : Au lieu de détailler le calcul comme précédemment, il est possible de remarquer, d'une manière formelle, que la concentration en forme acide HA est égale à :  $[HA] = \frac{C}{1 + 10^{pH-pK_a}}$ . Cette relation servira dans l'exercice 21.

- Calcul de la masse " m " de dihydrogénophosphate de potassium ( $KH_2PO_4$ ) à peser pour obtenir 1 litre de solution à 0,199 mol d'ions  $H_2PO_4^-$  par litre

La concentration massique d'une solution s'obtient en multipliant, dans un système d'unités concordant, la concentration molaire de la solution par la masse molaire moléculaire du soluté en solution :  $\rho = C \cdot M$

Or, la concentration massique d'une solution est, par définition, la masse du soluté ramenée au volume de solution préparée ( $V_{sp}$ ). Il est alors possible d'écrire la formule littérale suivante :  $m = C \cdot V_{sp} \cdot M$

Soit  $m = 0,199 \cdot 1 \cdot 136,09 = 27,08 \text{ g}$

- Calcul de la masse " m' " de monohydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ ) à peser pour obtenir 1 litre de solution à 0,301 mol d'ions  $HPO_4^{2-}$  par litre

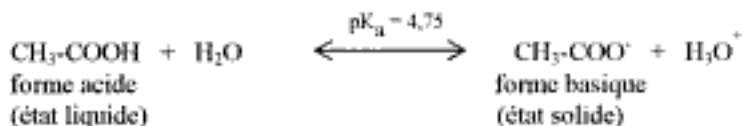
De la même manière  $m' = 0,301 \cdot 1 \cdot 174,18 = 52,43 \text{ g}$

- Le mode opératoire peut être le suivant :

- peser 27,08 g de  $KH_2PO_4$  ;
- dissoudre dans environ 300 mL d'eau distillée ;
- peser de 52,4 g de  $K_2HPO_4$  ;
- ajouter cette masse à la préparation précédente ;
- mélanger ;
- (vérifier au pH-mètre à la température d'utilisation) ;
- transvaser dans un fiole jaugée de 1000 mL et ajuster à 1000 mL avec de l'eau distillée.

#### Exercice 20 Préparation d'un litre de tampon acétate pH = 4,75 ( $pK_a = 4,75$ ) à 1,00 mol.L<sup>-1</sup>

Les formes acide faible et base conjuguée du tampon acétate sont respectivement l'acide acétique et l'acétate. L'équilibre à considérer dans ce tampon est :



Dans la mesure où on dispose d'acide sous forme liquide et de base sous forme solide, la préparation du tampon consiste à :

- prélever un volume donné d'acide acétique cristallisable ;
- peser une masse déterminée d'acétate de sodium.

Ce volume et cette masse sont celles permettant l'obtention des concentrations d'acide et de base satisfaisant à l'équation de Henderson - Hasselbalch.

Il faut noter que, dans le cas présent, le pH du tampon étant égal au  $pK_a$ , les concentrations d'acide et de base sont égales à la moitié de la concentration du tampon soit ici à  $1,00 / 2 = 0,500 \text{ mol.L}^{-1}$ .

- Calcul du volume d'acide acétique cristallisable à prélever :

Pour 1 litre de solution tampon à  $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ , il faut apporter 0,500 mol d'acide acétique, c'est-à-dire une masse de  $0,500 \cdot 60,07 = 30,04 \text{ g}$  d'acide acétique.

Le volume V de solution commerciale à prélever est de :

$$V = \frac{m}{\% \cdot \rho \cdot 10^{-3}}$$

- avec
- m : masse d'acide acétique en g, ici 30,04 g ;
  - % : pureté en pourcent ;
  - $\rho$  : masse volumique en  $\text{g.mL}^{-1}$ ,  $1,05 \text{ g.mL}^{-1}$
- ( $\rho$  exprimé en  $\text{g.mL}^{-1}$  est numériquement égal à la densité de la solution commerciale).

L'application numérique donne le résultat suivant :  $V = \frac{30,04}{\frac{100}{100} \cdot 1,05 \cdot 10^{-3}} = 28,61 \cdot 10^{-3} \text{ L}$  soit 28,61 mL.

- Calcul de la masse d'acétate de sodium à peser pour obtenir 1 litre de solution à  $0,500 \text{ mol.L}^{-1}$  :

La concentration massique d'une solution s'obtient en multipliant, dans un système d'unités concordant, la concentration molaire de la solution par la masse molaire moléculaire du soluté en solution :  $\rho = C \cdot M$

Or, la concentration massique d'une solution est par définition la masse du soluté ramenée au volume de solution préparée ( $V_{SP}$ ). Il est alors possible d'écrire la formule littérale suivante :  $m = C \cdot V_{SP} \cdot M$

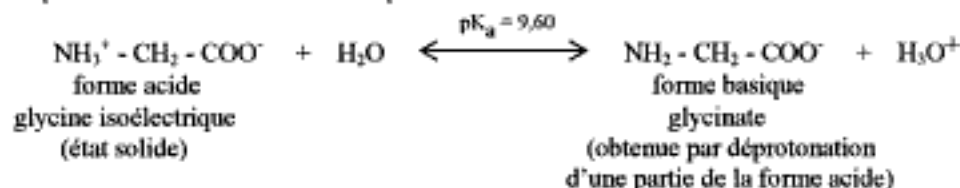
Soit  $m = 0,500 \cdot 1 \cdot 82,03 = 41,02 \text{ g}$

- Le mode opératoire peut être le suivant :

- peser 41,02 g d'acétate de sodium ;
- dissoudre dans environ 300 mL d'eau distillée ;
- ajouter environ 28,5 mL d'acide acétique ;
- mélanger ;
- (vérifier au pH-mètre à la température d'utilisation) ;
- transvaser dans un fiole jaugée de 1000 mL et ajuster à 1000 mL avec de l'eau distillée.

**Exercice 21** Préparation de 500 mL de tampon glycine pH = 9,00 ( $pK_a$  à considérer : 9,60) à  $1,20 \text{ mol.L}^{-1}$

Les formes acide faible et base conjuguée du tampon glycine pH = 9,00 sont respectivement la forme isoélectrique et la forme glycinate. L'équilibre à considérer dans ce tampon est :



Dans la mesure où on dispose d'acide sous forme solide, la préparation du tampon consiste à :

- peser une masse de forme acide (glycine isoélectrique) correspondant à la concentration totale du tampon ( $1,20 \text{ mol.L}^{-1}$ ) ;
- prélever un volume de solution de NaOH permettant de déprotoner une partie de cette forme acide.

Cette masse et ce volume permettent l'obtention des concentrations d'acide et de base satisfaisant à l'équation de Henderson - Hasselbalch.

Calculons la concentration de la forme acide (glycine isoélectrique) au pH désiré :  $[\text{HA}] = \frac{C}{1 + 10^{pH - pK_a}}$  (voir exercice 19)

L'application numérique donne le résultat suivant :  $[\text{HA}] = \frac{1,20}{1 + 10^{9,00 - 9,60}} = 0,959 \text{ mol.L}^{-1}$

Donc  $[\text{HA}] = 0,959 \text{ mol}$  de glycine isoélectrique par litre de tampon.

Et  $[\text{A}^-] = 1,20 - 0,959 = 0,241 \text{ mol}$  de glycinate de sodium par litre de tampon.

- Calcul de la masse de glycine isoélectrique à peser pour obtenir 0,5 litre de solution  $1,20 \text{ mol.L}^{-1}$

La concentration massique d'une solution s'obtient en multipliant, dans un système d'unités concordant, la concentration molaire de la solution par la masse molaire moléculaire du soluté en solution :  $\rho = C \cdot M$

Or, la concentration massique d'une solution est par définition la masse du soluté ramenée au volume de solution préparée ( $V_{SP}$ ). Il est alors possible d'écrire la formule littérale suivante :  $m = C \cdot V_{SP} \cdot M$

Soit  $m = 1,20 \cdot 0,5 \cdot 75,00 = 45,00 \text{ g}$

- Calcul du volume de solution de NaOH à  $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$  à prélever

Dans la solution tampon, la concentration de la forme basique de la glycine est de  $0,241 \text{ mol.L}^{-1}$ . Cette forme basique est obtenue par déprotonation de la glycine isoélectrique par NaOH. Le nombre de mol " n " de glycine sous forme basique et égal au nombre de mol " n " de NaOH introduit :

$$\begin{aligned} n &= n' \\ \Leftrightarrow C \cdot V &= C' \cdot V' \\ \Leftrightarrow V' &= \frac{C \cdot V}{C'} \end{aligned}$$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $V' = \frac{0,241 \cdot 0,5}{1,00} = 120,5 \cdot 10^{-3} \text{ L}$  soit 120,5 mL.

- Le mode opératoire peut être le suivant :

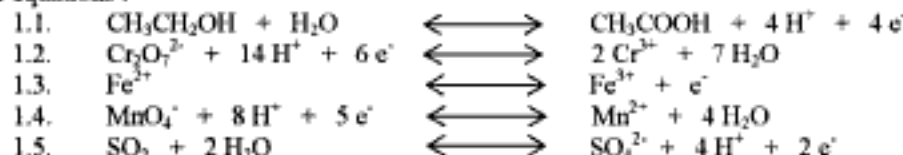
- peser 45,00 de glycine isoélectrique ;
- dissoudre dans environ 200 mL d'eau distillée ;



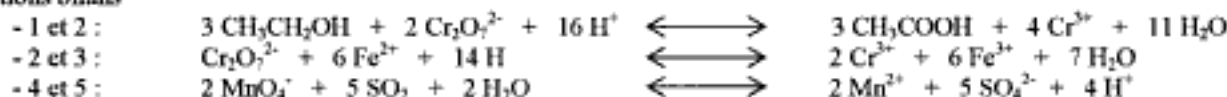
- ajouter environ 120 mL d'acide chlorhydrique 1 mol.L<sup>-1</sup> ;
- mélanger ;
- (vérifier le pH au pH-mètre à la température d'utilisation) ;
- transvaser dans une fiole jaugée de 500 mL et ajuster à 500 mL avec de l'eau distillée.

**Exercice 22** Equations d'oxydo-réduction

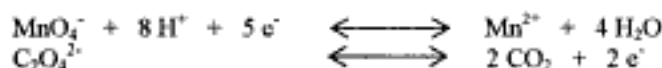
## 1. Demi-équations :



## 2. Equations bilans

**Exercice 23** Etalonnage d'une solution de KMnO<sub>4</sub> par pesée directe d'oxalate de sodium anhydre (CO<sub>2</sub> / C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>)

## 1. Réactions mises en jeu



## 2. Concentration molaire de la solution de permanganate de potassium

A l'équivalence, le nombre de moles " n " d'électrons acceptés par l'oxydant (MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>) est égal au nombre de moles " n' " d'électrons cédés par le réducteur (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

$$n = n'$$

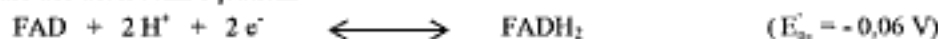
$$\Leftrightarrow C \cdot V \cdot 5 = \frac{m'}{M'} \cdot 2$$

$$\Leftrightarrow C = \frac{m' \cdot 2}{M' \cdot V \cdot 5}$$

L'application numérique donne le résultat suivant :  $C = \frac{0,0989 \cdot 2}{(2 \cdot 12 + 4 \cdot 16 + 2 \cdot 23) \cdot 14,25 \cdot 10^{-3} \cdot 5} = 0,0207 \text{ mol.L}^{-1}$

**Exercice 24** Potentiels standard en biochimie

## 1. Ecriture des deux demi équations :



Les électrons circulent dans le sens des potentiels croissants.  $E'_{o_1} < E'_{o_2}$  donc le FAD se situe en amont par rapport au cyt b.

2. Le potentiel standard biochimique est identique au potentiel standard chimique sauf pour la concentration en protons. En chimie, on considère une concentration en protons de 1 mol.L<sup>-1</sup>, tandis qu'en biochimie, on considère généralement une concentration en protons de 10<sup>-7</sup> mol.L<sup>-1</sup>, correspondant à pH = 7.

La relation de Nernst pour le FAD s'écrit :

$$E_1 = E_{o_1} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[\text{FAD}] \cdot [\text{H}^+]^2}{[\text{FADH}_2]}$$

$$\text{ou encore} \quad E_1 = E_{o_1} + \frac{0,06}{n} \cdot \log \frac{[\text{FAD}] \cdot [\text{H}^+]^2}{[\text{FADH}_2]}$$

$$\text{soit} \quad E_1 = E_{o_1} + \frac{0,06}{n} \cdot \log [\text{H}^+]^2 + \frac{0,06}{n} \cdot \log \frac{[\text{FAD}]}{[\text{FADH}_2]}$$

La concentration en protons étant fixe, il est possible d'intégrer le terme contenant la concentration en protons ( $[H^+]$ ) à  $E_0$ , l'ensemble étant  $E'_0$  ou potentiel standard biochimique :

$$E'_{0_1} = E_{0_1} + \frac{0,06}{n} \cdot \log [H^+]^2$$

L'application numérique donne le résultat suivant :

$$E'_{0_1} = -0,06 + \frac{0,06}{2} \cdot \log [10^{-7}]^2 = +0,36 \text{ V}$$

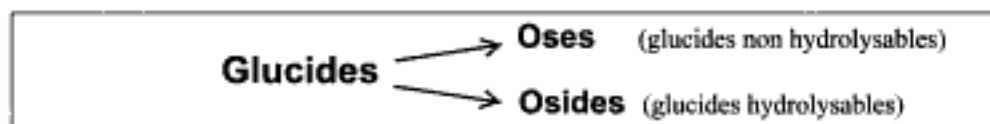
Pour ce qui concerne le cyt b,  $E'_{0_2} = E_{0_2}$ , puisqu'il n'y a pas d'intervention de protons.

Cette fois-ci  $E'_{0_1}$  est supérieur à  $E_{0_2}$  et le FAD devrait intervenir après le cyt b au cours du transfert des électrons, ce qui est contraire à la réalité cellulaire. Cela démontre que les potentiels standard chimiques ne sont pas adaptés à la prédiction des réactions d'oxydo-réduction cellulaires. Les potentiels standard biochimiques sont, même si les concentrations cellulaires sont loin d'être celles prévues pour les conditions standard, mieux adaptés à cette prédiction.

II

***LES BIOMOLÉCULES  
ET LEUR TRANSFORMATION***

## 2 - Glucides



### Oses

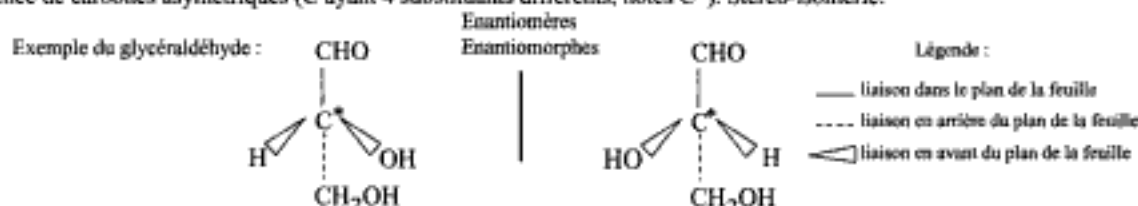
#### 1. Définition

Polyhydroxyaldéhydes ou polyhydroxycétones caractérisés par le nombre " n " d'atomes de carbone (trioses, tétroses, pentoses, hexoses, ...) et par la nature de la fonction carbonyle (aldéhyde → aldoses, cétone → cétooses)

#### 2. Structure et nomenclature

##### 2.1. Structure linéaire

- Présence de carbones asymétriques (C ayant 4 substituants différents, notés C\*). Stéréo-isomérie.



- Projection de Fischer. On fait passer le plan de projection par le C\* :



- Convention de Fischer : position de l'hydroxyle alcoolique secondaire porté par le C\* le plus éloigné de la fonction réductrice (aldéhyde ou cétone) dans la projection de Fischer

- OH à droite du squelette carboné  
SÉRIE D

- OH à gauche du squelette carboné  
SÉRIE L

##### 2.2. Filiation des oses (série D)

A partir d'un ose à n C, il est possible d'obtenir les oses à n+1 C par synthèse de Kiliani-Fischer. Symétriquement, la dégradation de Wohl permet de passer de l'ose à n C à celui à n-1 C.

Des épimères sont des stéréo-isomères non énantiomères ne différant que par la configuration d'un carbone asymétrique.

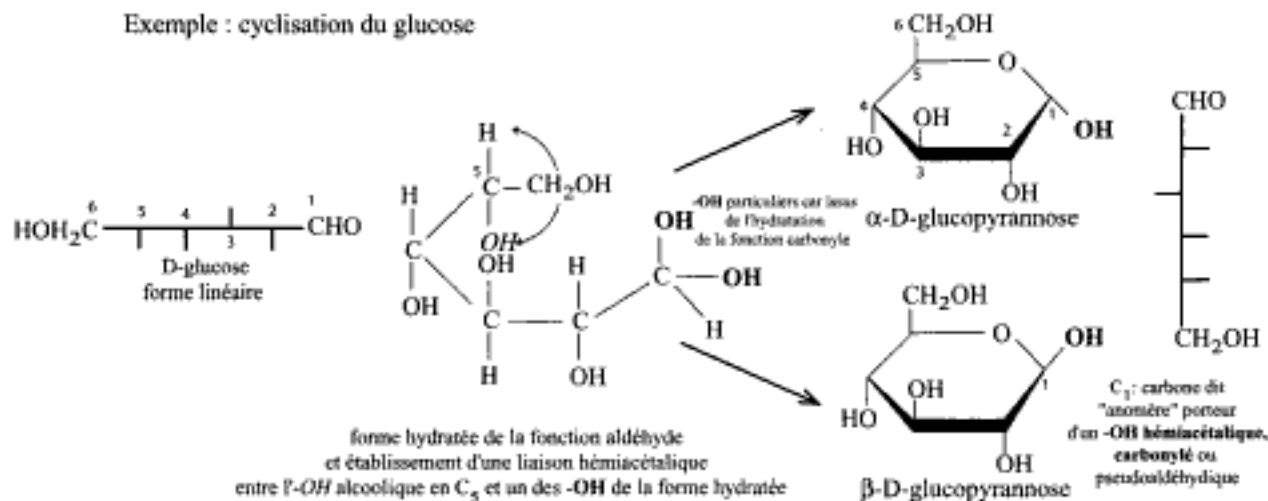
| Aldoses                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Cétooses                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Aldotrioses</b><br/>n = 3<br/>1 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>D-glycéraldéhyde</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <p><b>Cétootrioses</b><br/>n = 3<br/>0 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>dihydroxyacétone</p>                                                    |
| <p><b>Aldotétraoses</b><br/>n = 4<br/>2 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>4<br/>D-érythrose      D-thréose</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p><b>Cétootétraoses</b><br/>n = 4<br/>1 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>4<br/>D-érythrose</p>                                                 |
| <p><b>Aldopentoses</b><br/>n = 5<br/>3 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>4<br/>5<br/>D-ribose      D-arabinose      D-xylose      D-lyxose</p>                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p><b>Cétopentoses</b><br/>n = 5<br/>2 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>4<br/>5<br/>D-ribulose      D-xylulose</p>                              |
| <p><b>Aldohexoses</b><br/>n = 6<br/>4 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>4<br/>5<br/>6<br/>D-allose    D-altrose    D-glucose    D-mannose    D-galose    D-idose    D-galactose    D-talose</p> <p style="font-size: 0.8em;">All altrasts gloomy makes gams in gallon tanks.<br/>Alle alte Gänze möchten gern im Garten tanzen.<br/>(Phrases mnémotechniques pour retenir le nom des isomères du D-glucose)</p> | <p><b>Cétohexoses</b><br/>n = 6<br/>3 C*</p> <p style="text-align: center;">1<br/>2<br/>3<br/>4<br/>5<br/>6<br/>D-psicose    D-fructose    D-sorbose    D-tagatose</p> |

## 2.3. Structure cyclique (Haworth)

### 2.3.1. Passage de la forme linéaire à la forme cyclique formellement dérivée du pyranne

Formes pyraniques issues d'une hémicétylation entre  $C_1$  et  $C_5$  pour les aldoses à plus de 4 C  
entre  $C_2$  et  $C_6$  pour les cétooses à plus de 5 C

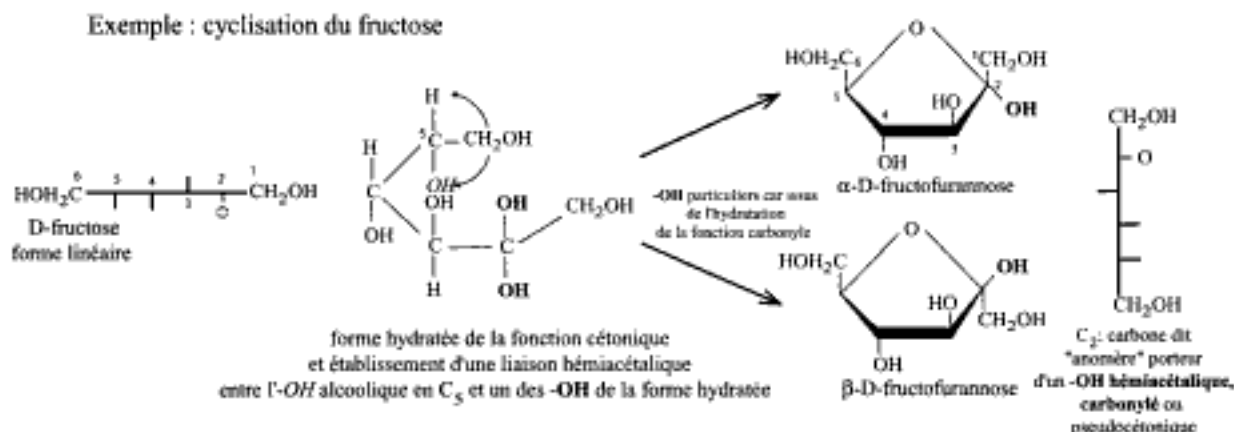
Exemple : cyclisation du glucose



### 2.3.2. Passage de la forme linéaire à la forme cyclique formellement dérivée du furanne

Formes furanniques issues d'une hémicétylation entre  $C_2$  et  $C_5$  pour les cétooses à plus de 5 C  
entre  $C_1$  et  $C_4$  pour les aldoses à plus de 4 C

Exemple : cyclisation du fructose

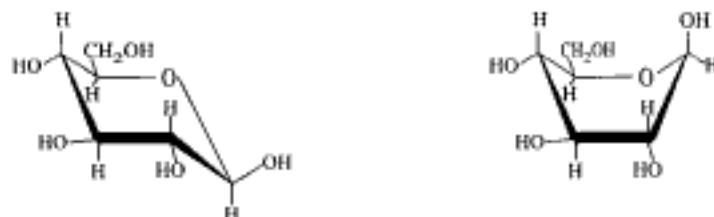


### 2.3.3. Représentation des oses selon Haworth

- Un hémicétyl cyclique à 6 atomes est appelé pyranique, celui à 5 atomes furannique ;
- le plan équatorial du cycle est horizontal et perpendiculaire à la feuille ;
- les substituants (-H et -OH) se trouvant à droite dans les projections linéaires de Fischer sont dirigés vers le bas, ceux orientés vers la gauche sont dirigés vers le haut ;
- dans la série D, l'hydroxyle hémicétylique (-OH) de l'anomère  $\alpha$  est en dessous du plan du cycle, c'est-à-dire en position trans par rapport au -CH<sub>2</sub>OH substituant du  $C_5$ , celui de l'anomère  $\beta$  au-dessus du plan du cycle ;
- en outre, certains usages ont voulu que l'on ne fasse figurer ni les carbones, ni les -H ; les hydroxyles sont alors visualisés par un tiret vertical, à l'exception de l'hydroxyle hémicétylique qui peut rester visualisé.

## 2.4. Conformation spatiale des oses

Exemples : configuration stable (dite "en chaise") du  $\beta$ -D-glucopyranose et configuration (dite "en bateau") du  $\beta$ -D-glucopyranose



### 3. Propriétés des oses

#### 3.1. Propriétés physiques

Pouvoir rotatoire lié au C\* : loi de Biot

$$\alpha = [\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} \cdot C \cdot l$$

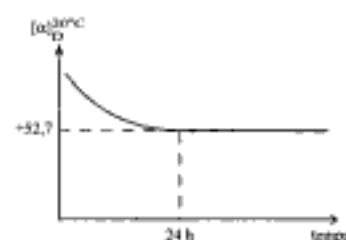
$\alpha$  : angle de rotation en  $^\circ$

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$  : pouvoir rotatoire spécifique en  $^\circ \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$  à  $20^\circ\text{C}$  et à 589 nm (raie D du sodium)

C : concentration de la solution en  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

l : longueur du tube polarimétrique en dm.

Mutarotation liée à la présence d'un -OH hémiacétalique (exemple d'une solution de glucose : en fait, isomérisation en fonction du temps d'une solution initialement d' $\alpha$ -D-glucopyranose, forme de commercialisation du glucose)



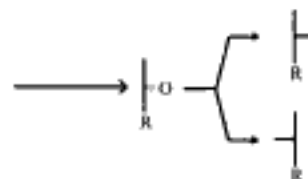
#### 3.2. Propriétés chimiques

##### 3.2.1. Propriétés du carbonyle (-OH hémiacétalique pseudo-aldéhyde en C<sub>1</sub> ou pseudocétonique en C<sub>2</sub>)

- Réduction des oses, formation de polyalcools

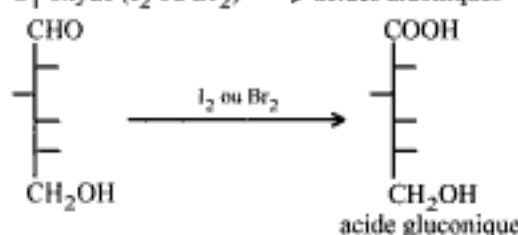
aldoses  $\longrightarrow$  1 polyalcool unique

cétooses  $\longrightarrow$  2 polyalcools épimères

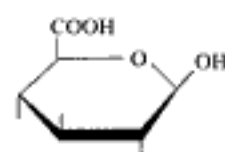


- Oxydation des oses

- C<sub>1</sub> oxydé (I<sub>2</sub> ou Br<sub>2</sub>)  $\longrightarrow$  acides aldoniques

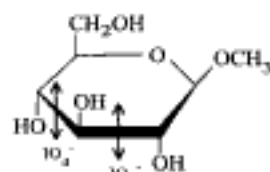
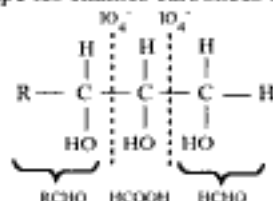


- C<sub>6</sub> oxydé  $\longrightarrow$  acides uroniques



acide  $\beta$ -D-glucuronique

- HIO<sub>4</sub> coupe les chaînes carbonées des  $\alpha$ -glycols



exemple de l'oxydation du glucose après blocage de la fonction aldéhyde

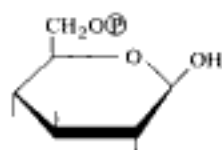
- Propriétés réductrices des oses vis-à-vis :

- de complexes métalliques : Cu<sup>2+</sup> (Fehling et Bertrand) ;

- de complexes organiques : acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS).

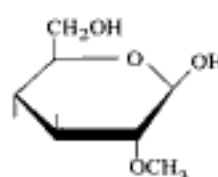
##### 3.2.2. Propriétés de la fonction alcool

- Estérification (action d'acides) : acides minéraux (esters phosphoriques) ; esters organiques (associations glycolipidiques).
- Éthérification (action d'alcools) : alkylation (par exemple, méthylation).



$\beta$ -D-glucose-6-phosphate

éther oxyde méthylique en C<sub>2</sub> du  $\beta$ -D-glucose



## 4. Dosage d'oses et d'osides simples

### 4.1. Méthodes physiques

- Polarimétrie (loi de Biot) applicable à des solutions concentrées ( $> 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).
- Réfractométrie (réfractomètre ; détecteur HPLC).

### 4.2. Méthodes chimiques

#### 4.2.1. Méthodes réductométriques (milieu basique et à chaud) ; réactions non-stoechiométriques

- **Composés minéraux** : par exemple,  $\text{Cu}^{2+}$  à chaud  

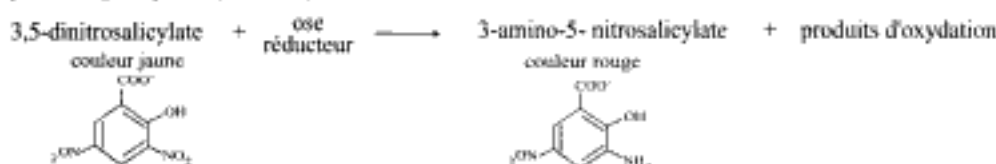
$$\text{glucide réducteur} + 2 \text{Cu}^{2+} \xrightarrow[\text{OH}^-]{\text{à chaud}} \text{Cu}_2\text{O} + \text{produits d'oxydation}$$

composé                      oxyde cuivreux rouge  
sel cuivrique Cu(II)                      sel cuivreux Cu(I)

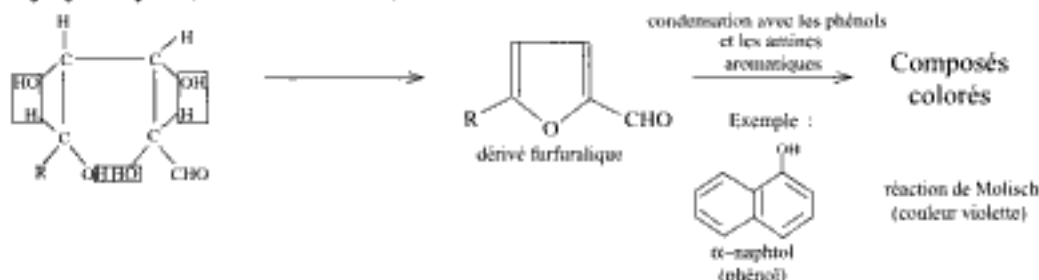
Détermination de la quantité de glucide réduisant la quantité d'une prise d'essai de solution cuivrique (méthode de Fehling).

Dosage du  $\text{Cu}_2\text{O}$  formé par réduction d'une solution de sulfate de cuivre en sulfate ferreux ; celui-ci est alors dosé par manganimétrie (méthode de Bertrand).

- **Composés organiques** : par exemple, 3,5 DNS (3,5-dinitrosalicylate)

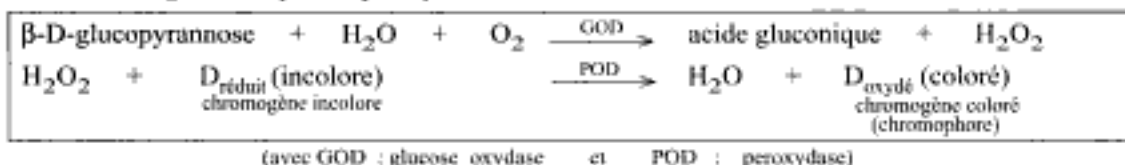


#### 4.2.2. Méthodes furfuraliques (milieu acide et à chaud)

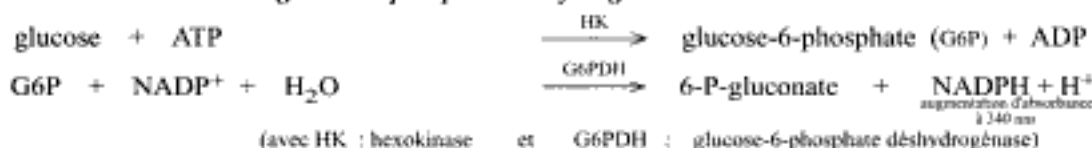


### 4.3. Méthodes enzymatiques

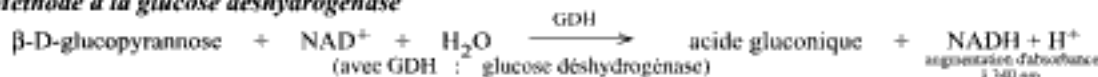
#### 4.3.1. Méthodes à la glucose oxydase / peroxydase



#### 4.3.2. Méthode à l'hexokinase / glucose-6-phosphate déshydrogénase



#### 4.3.3. Méthode à la glucose déshydrogénase



Remarque : pour les réactions spécifiques du  $\beta$ -D-glucopyranose, on ajoute souvent une mutarotase, d'où une accélération de la réaction de transformation :

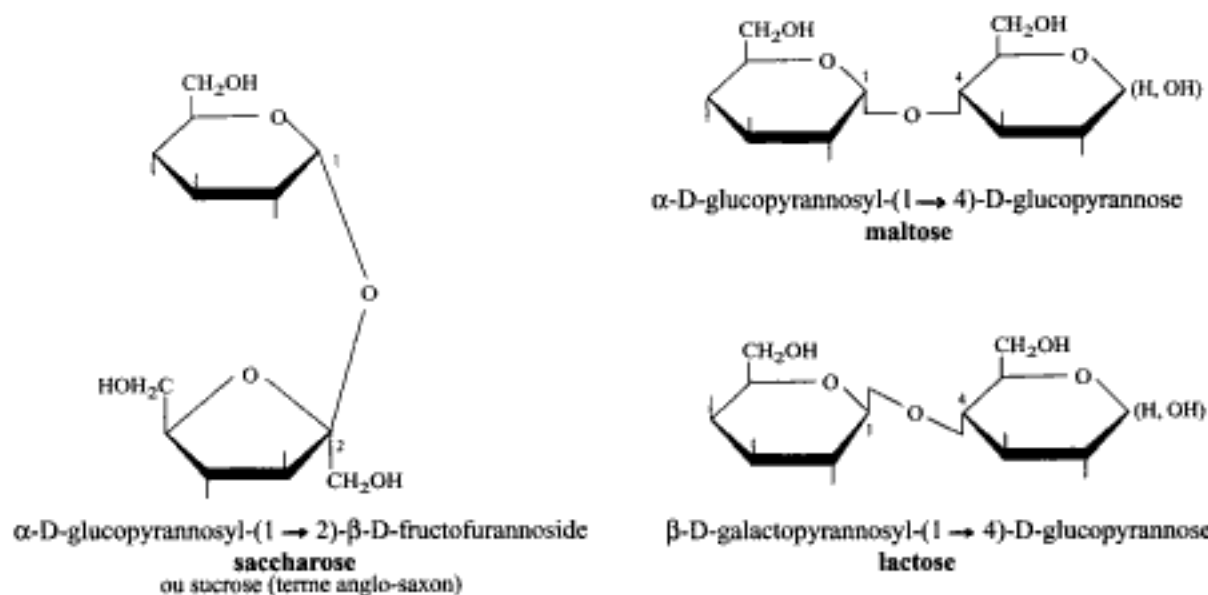
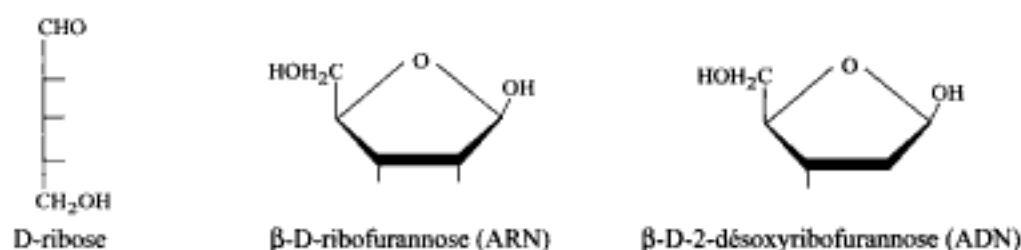
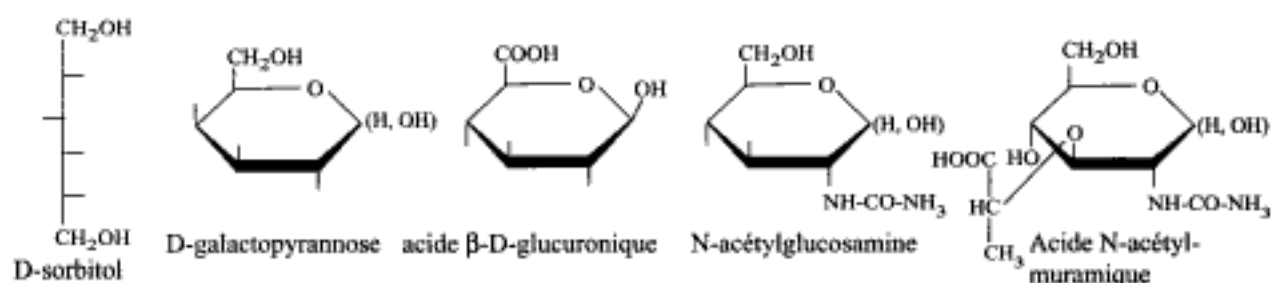
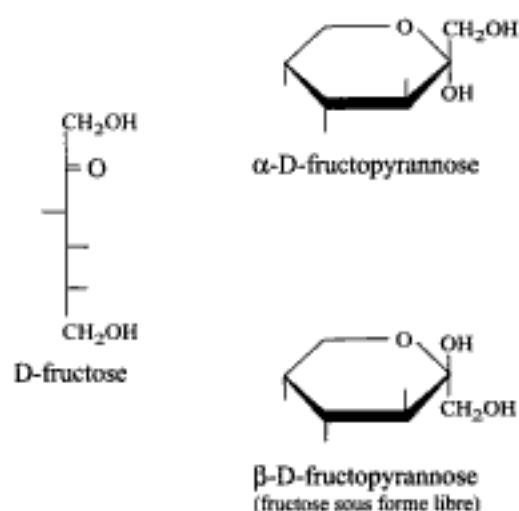
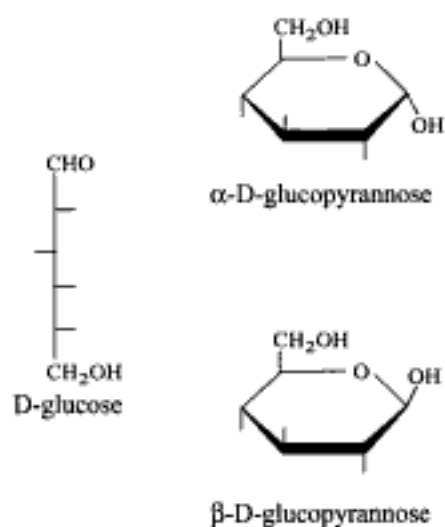


### 4.4. Méthodes chromatographiques (exemples)

- Séparation sur colonne polaire et détection par réfractométrie
- Séparation de dérivés d'oses par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

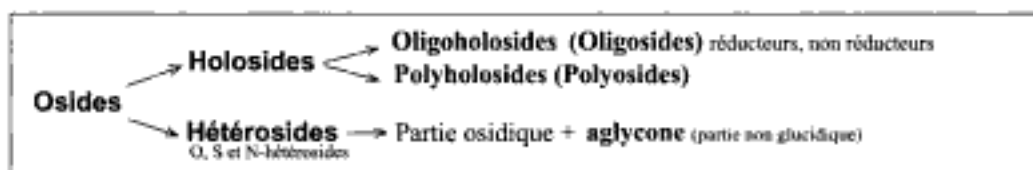
Dans les deux cas, il est nécessaire d'étalonner ; la surface du pic est proportionnelle à la quantité d'ose présente.

## 5. Principaux oses et diholosides





## Osides

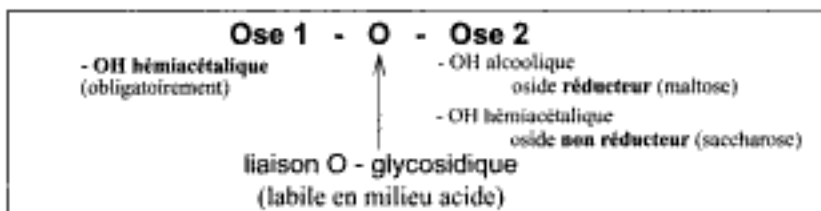


### 1. Holosides

Par hydrolyse, les holosides ne donnent que des oses ou des dérivés d'oses.

Présence d'une liaison glycosidique ou liaison osidique.

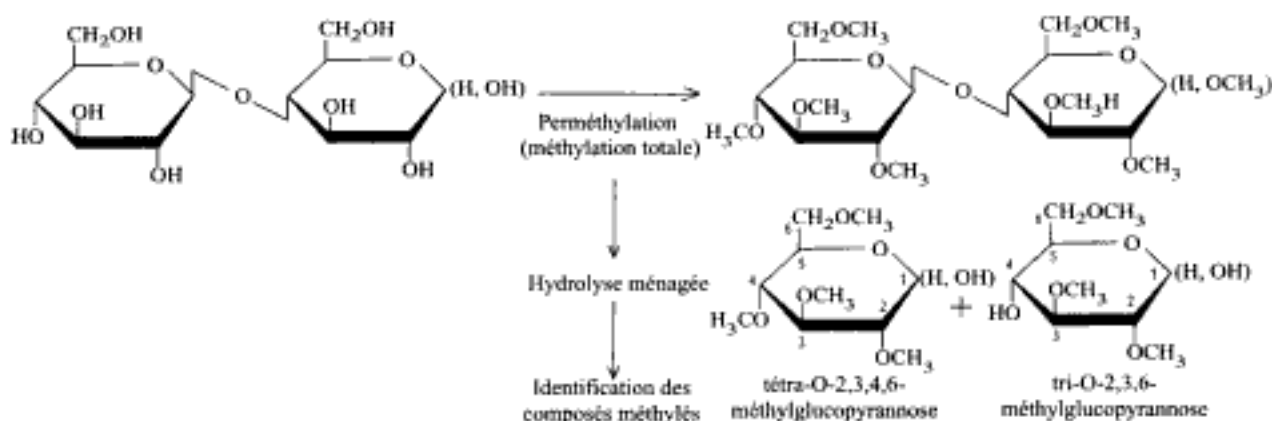
Exemple : diholoside (liaison O-glycosidique)



#### 1.1. Oligoholosides ou oligosides (nombre de résidus inférieur à 10)

##### 1.1.1. Détermination de la structure des oligoholosides

- Détermination de la nature des oses : hydrolyse acide et identification par CCM, CPG ou HPLC après dérivation éventuelle.
- Détermination du mode de liaison des oses dans un diholoside :
  - détermination de l'ose 1 (ose porteur de l'hydroxyle hémiacétalique engagé dans la liaison glycosidique) ;
  - détermination de l'hydroxyle de l'ose 2 engagé dans la liaison glycosidique.



- Détermination de la configuration anomérique de la liaison glycosidique.

##### 1.1.2. Principaux oligoholosides

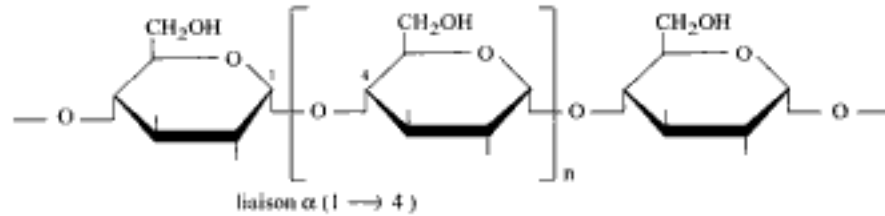
- **Diholoside non réducteur** :  
**Saccharose** ou sucrose :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-fructofurannoside
- **Diholosides réducteurs** :  
**Maltose** :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-D-glucopyranose  
**Lactose** :  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-D-glucopyranose  
**Cellobiose** :  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-D-glucopyranose

## 1.2. Polyholosides, polyosides, polysaccharides ou glycannes (plus de 10 résidus)

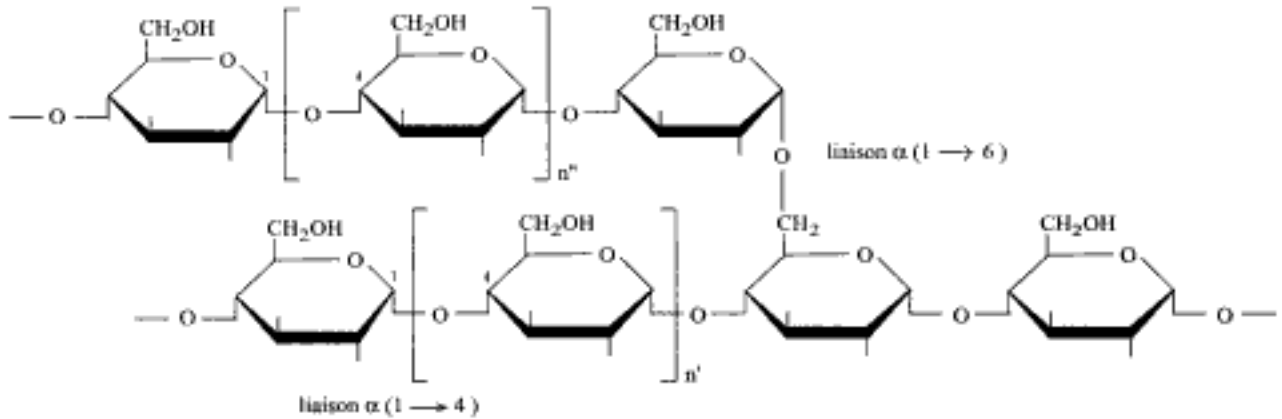
### 1.2.1. Polyosides homogènes (polymères d'un seul type d'oses), glucosannes

- **Amidon** : réserve glucidique des végétaux ; constitué d'amylose et d'isoamylose (amylopectine)

*Amylose* : chaîne linéaire



*Isoamylose* : chaîne ramifiée



- **Glycogène** : réserve glucidique des animaux ; polymère constitué de résidus  $\alpha$ -D-glucopyranose reliés par des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4)
- **Cellulose** : constituant de la paroi des cellules végétales ; polymère constitué de résidus  $\beta$ -D-glucopyranose reliés par des liaisons  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4)

### 1.2.2. Polyosides hétérogènes (polymères d'un seul type d'oses)

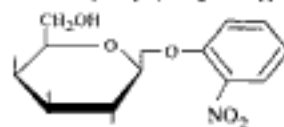
- Polyosides hétérogènes des plantes (gomme arabique)
- Polyosides hétérogènes bactériens (peptidoglycannes)
- Glycoaminoglycannes (mucopolysaccharides)

## 2. Hétérosides

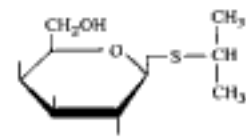
Combinaison d'un ou plusieurs oses par un -OH hémiacétalique avec une fraction non glucidique (aglycone)

- O-hétérosides
- S-hétérosides
- N-hétérosides (liaison entre l'ose et la base azotée des acides nucléiques - Voir "Biologie moléculaire" )

**ONPG**  
2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranose  
ou o-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranose ou  
ortho-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranose



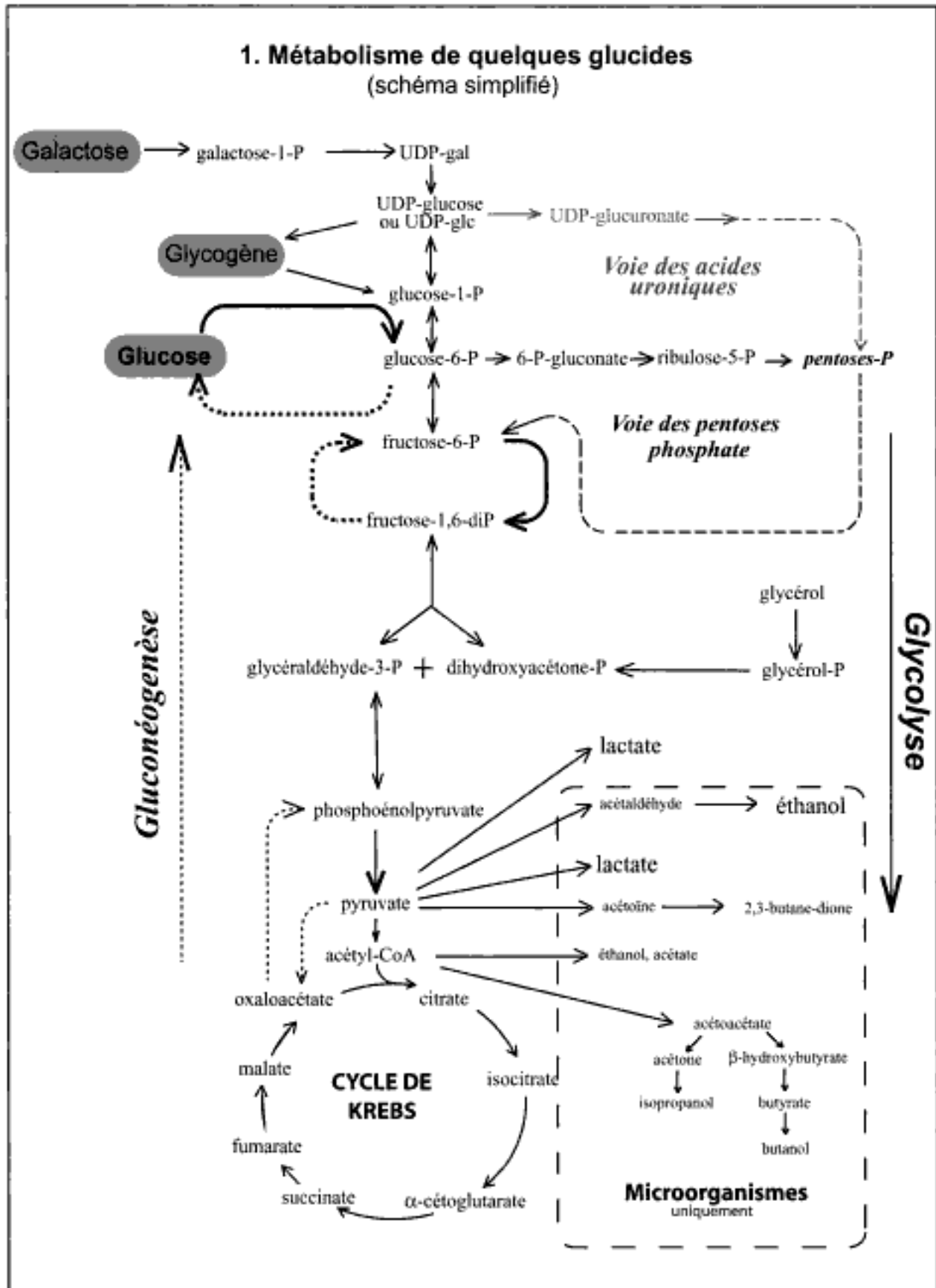
**IPTG**  
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside



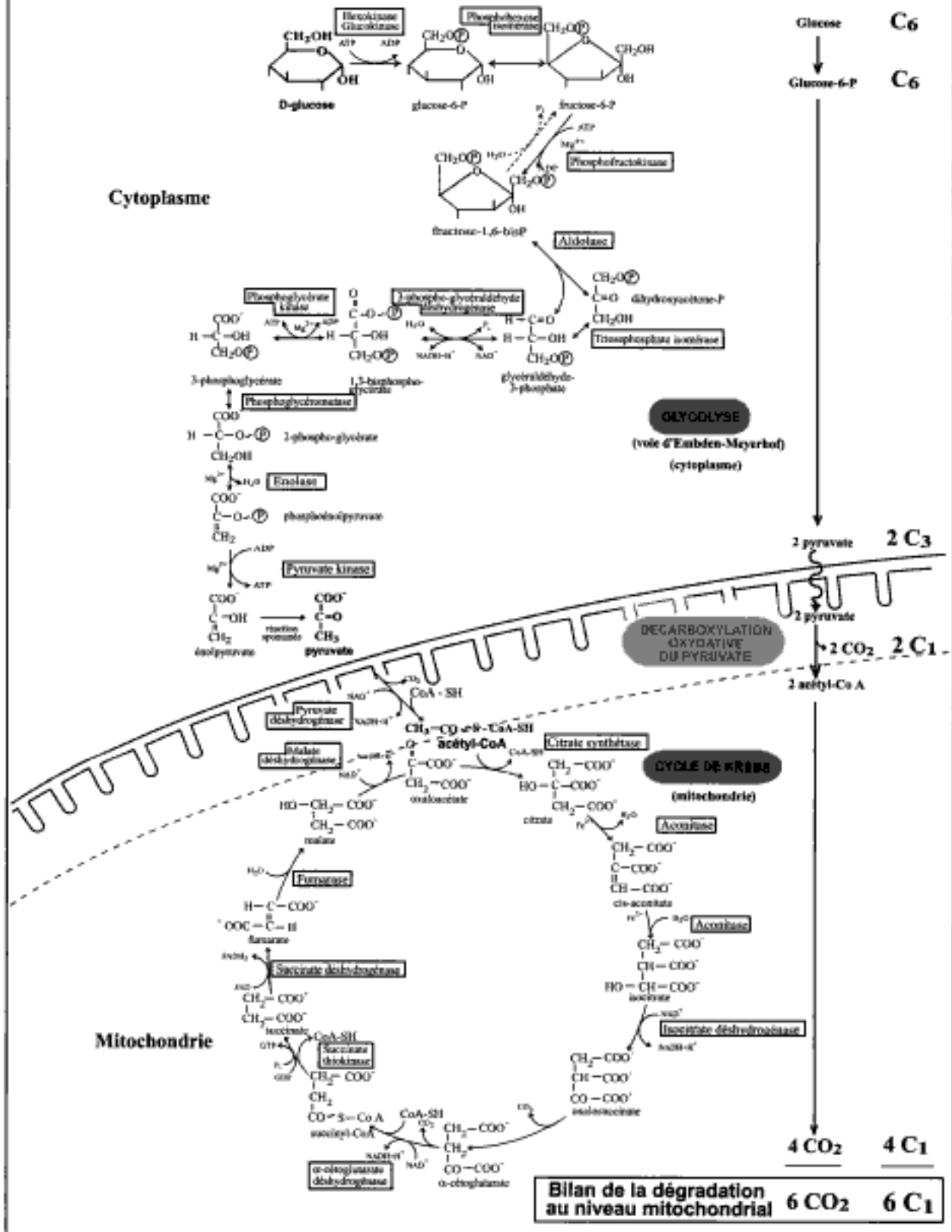
## 3. Glycoconjugués

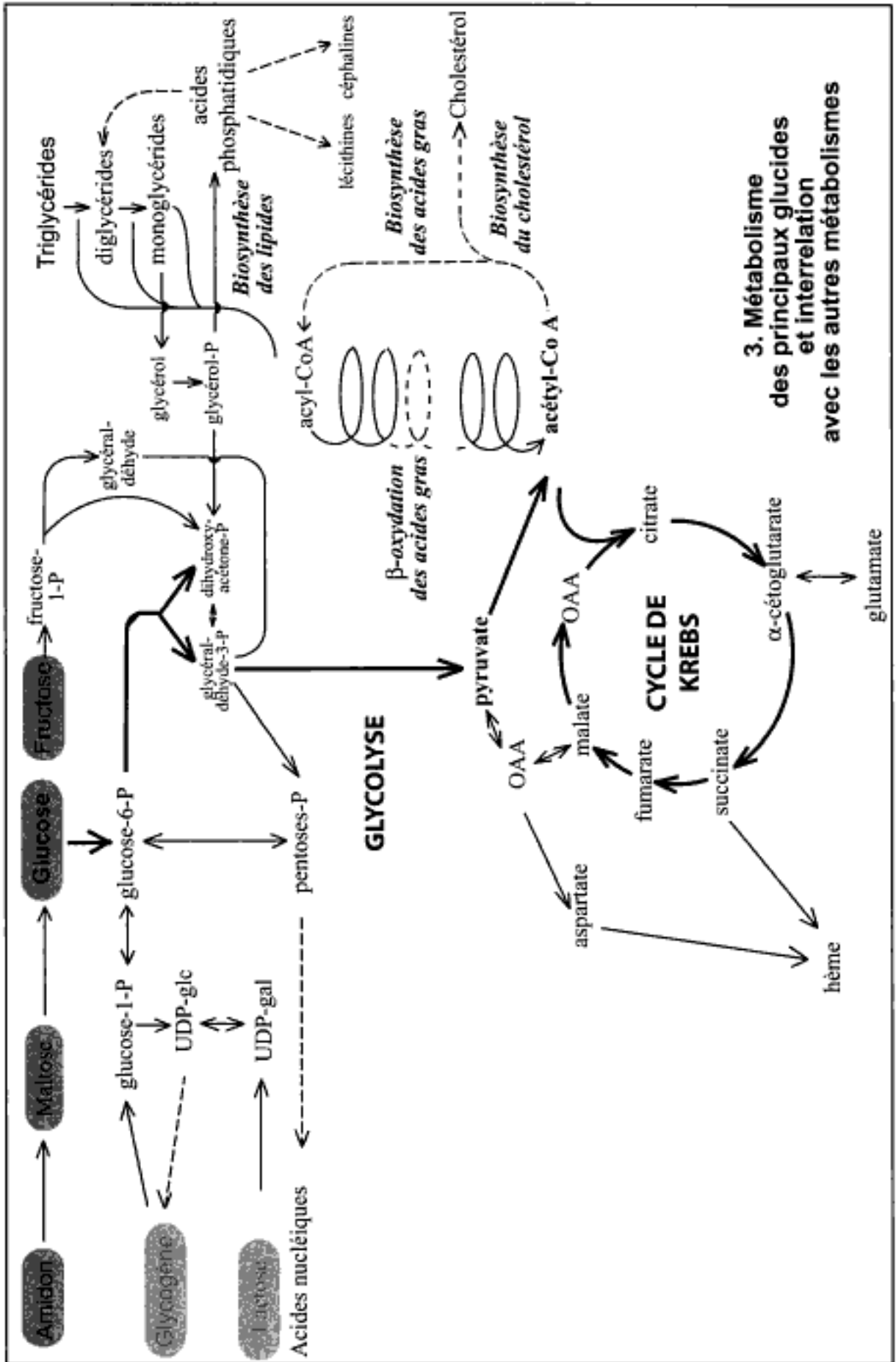
- **Glycoprotéines**  
Hétéroprotéines résultant de l'union d'une fraction glucidique avec une fraction protéique uniquement par covalence (glucides > à 5 %) : mucus, sérum, groupes sanguins, lectines ou phytoagglutinines, membranes cellulaires.
- **Glycolipides**  
Séquences glycanniques unies avec une fraction lipidique par covalence : membranes cellulaires, plantes, bactéries.

## Éléments sur le métabolisme des glucides



## 2. Glycolyse et cycle de Krebs





**3. Métabolisme des principaux glucides et interrelation avec les autres métabolismes**

## Énoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

### Exercice 1 Étude d'un glucide

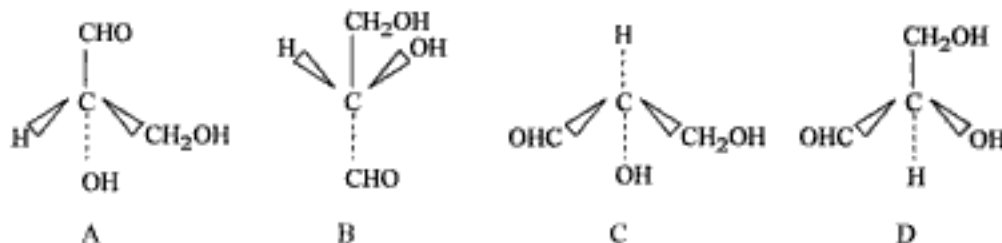
Soit le glucide suivant :



1. A quelle famille et à quel groupe appartient-il ? Justifier la réponse.
2. Numéroté les atomes de carbone de ce glucide.
3. En se limitant aux formules linéaires des oses, préciser le nombre d'isomères correspondant à sa formule.
4. Représenter l'ensemble des isomères.

### Exercice 2 Projection de Fischer

Représenter les structures suivantes du glycéraldéhyde en projection de Fischer et préciser la configuration.



### Exercice 3 Recherche d'épimères

Parmi les oses suivants, lesquels sont épimères l'un de l'autre : D-ribose, D-lyxose, D-xylose, D-glucose, D-gulose, D-galactose, D-mannose, D-talose ?

### Exercice 4 Rhamnose et fucose

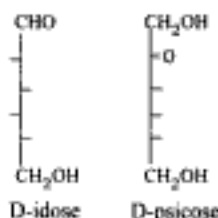
Le L-rhamnose, constituant de certaines bactéries, est le 6-désoxy-L-mannose. Quelle est sa structure en projection de Fischer ? Combien a-t-il d'isomères ? Le L-fucose ou 6-désoxy-L-galactose en fait-il partie ?

### Exercice 5 Formule cyclique du galactopyranose

Comment passe-t-on de la formule linéaire du D-galactose à la formule cyclique pyranique ? Représenter l' $\alpha$ -D-galactopyranose et le  $\beta$ -D-galactopyranose.

### Exercice 6 Passage de formes linéaires à des formes cycliques

A partir des formules linéaires données ci-dessous :



écrire les formules cycliques correspondant aux composés suivants :  $\alpha$ -D-idopyranose,  $\beta$ -D-idofuranose,  $\beta$ -D-psicopyranose,  $\alpha$ -D-psicofuranose.

**Exercice 7** Calcul du pouvoir rotatoire d'une solution de fructose

Calculer le pouvoir rotatoire d'une solution de fructose de concentration molaire  $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$  sachant que le pouvoir rotatoire spécifique du fructose est de  $-92,5^\circ \text{ L.kg}^{-1}.\text{dm}^{-1}$  et que la longueur du tube polarimétrique est de 20 cm.

**Exercice 8** Polarimétrie : pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$  de l' $\alpha$ -D-glucopyranose est  $+112,2^\circ.\text{mL.g}^{-1}.\text{dm}^{-1}$ , celui du  $\beta$ -D-glucopyranose  $+18,7^\circ.\text{mL.g}^{-1}.\text{dm}^{-1}$ . Le pouvoir rotatoire spécifique d'une solution fraîchement préparée de glucose à  $1 \text{ g.mL}^{-1}$  diminue et se stabilise après un certain temps à  $+52,7^\circ.\text{mL.g}^{-1}.\text{dm}^{-1}$ .

1. Expliquer ce phénomène.
2. Calculer les proportions des deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  du D-glucose à l'équilibre ( $M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

**Exercice 9** Réduction des oses

Le glucose donne par réduction un polyalcool appelé sorbitol.

1. Ecrire la formule du D-sorbitol
2. Est-il possible d'obtenir du D-sorbitol à partir d'autres oses ? Si oui, donner leur(s) formule(s) et leur(s) nom(s).

**Exercice 10** Structures et propriétés des diholosides

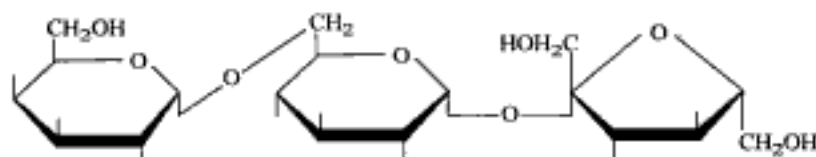
On considère les glucides suivants :

- A :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-fructofuranoside ;
- B :  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucopyranose ;
- C :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-glucopyranose.

1. Quels sont ces trois glucides ?
2. Ecrire les formules de A, B et C dans la représentation cyclique selon Haworth.
3. Quelle(s) propriété(s) s'explique(nt) par la liaison osidique chez ces glucides ?
4. Quels produits obtient-on à partir de A, B et C après méthylation ? Après méthylation suivie d'hydrolyse douce ?

**Exercice 11** Structure et propriétés d'un triholoside : le raffinose

Le raffinose a pour formule :

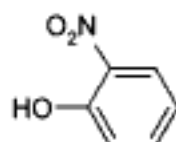


Préciser :

1. la nature des oses constitutifs et leur mode de liaison ;
2. la place du raffinose dans la classification des glucides ;
3. son comportement vis-à-vis des réactifs mettant en évidence le pouvoir réducteur (liqueur de Fehling, par exemple) ;
4. si sa solution fraîche présente le phénomène de mutarotation.

**Exercice 12** Structure et propriétés d'un hétéroside : l'ONPG

L'ONPG est l'ortho-nitro-phényl- $\beta$ -D-galactoside. Il s'agit d'un O-hétéroside constitué de  $\beta$ -D-galactose et d'ortho-nitro-phénol (2-nitro-phénol) de formule :

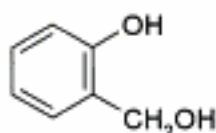


Préciser :

1. ce qu'est un O-hétéroside ;
2. la structure de l'ONPG ;
3. la réaction d'hydrolyse de l'ONPG.

**Exercice 13** Détermination de la structure d'un hétéroside après méthylation et hydrolyse

Par hydrolyse enzymatique d'un hétéroside, on obtient un diholoside et l'alcool salicylique de formule :



1. Rappeler la définition d'un hétéroside.

Par méthylation et hydrolyse du diholoside, on obtient le 2,3,4,6-tétraméthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose et le 2,3,4-triméthyl- $\beta$ -D-glucopyranose.

2. Donner la formule du diholoside. Est-il réducteur ?

3. Indiquer sa formule sachant que l'hétéroside donne les diverses réactions colorées des phénols.

**Exercice 14** Dosage d'un mélange glucose-lactose

1. Dosage du glucose, méthode colorimétrique à la glucose-oxydase

Le tableau ci-dessous résume les opérations effectuées et les résultats obtenus :

| Tubes                                                                  | Témoin | 1     | 2     | 3     | Essai |
|------------------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Solution étalon de glucose à 0,100 g.L <sup>-1</sup> (mL)              | 0,000  | 0,050 | 0,100 | 0,200 | /     |
| Mélange à doser dilué au 1/100 (mL)                                    | /      | /     | /     | /     | 0,200 |
| Réactif chromogène (mL)                                                | 2      | 2     | 2     | 2     | 2     |
| Attente 30 min à 37°C, puis H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 30 % (mL) | 2      | 2     | 2     | 2     | 2     |
| Absorbance à 530 nm                                                    | 0,000  | 0,220 | 0,450 | 0,890 | 0,690 |

Calculer la concentration massique du glucose dans le mélange à doser.

2. Dosage du pouvoir réducteur, méthode de Bertrand

Dans une fiole d'Erlenmeyer, on introduit 4 mL du mélange à doser, 20 mL d'une solution de CuSO<sub>4</sub>, 20 mL d'une solution alcaline de tartrate de sodium et potassium et 16 mL d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant exactement 3 minutes. Le précipité obtenu est lavé et dissout dans une solution de sulfate ferrique.

Il faut 13,55 mL d'une solution de permanganate de potassium à 0,0200 mol.L<sup>-1</sup> pour titrer le sulfate ferreux formé.

2.1. Calculer le volume de solution de permanganate nécessaire au dosage du pouvoir réducteur du glucose, en déduire le volume de solution de permanganate de potassium nécessaire au dosage du pouvoir réducteur du lactose.

2.2. Calculer la concentration massique du lactose dans le mélange.

Données : extraits des tables de Bertrand

|                                       |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| Glucose en mg dans la prise d'essai   | 25  | 26  | 27  | 28  | 29  | 30  | 31  | 32  | 33   | 34   | 35   |
| $\mu$ mol d'électrons pour le glucose | 781 | 810 | 840 | 870 | 900 | 930 | 958 | 988 | 1016 | 1046 | 1075 |

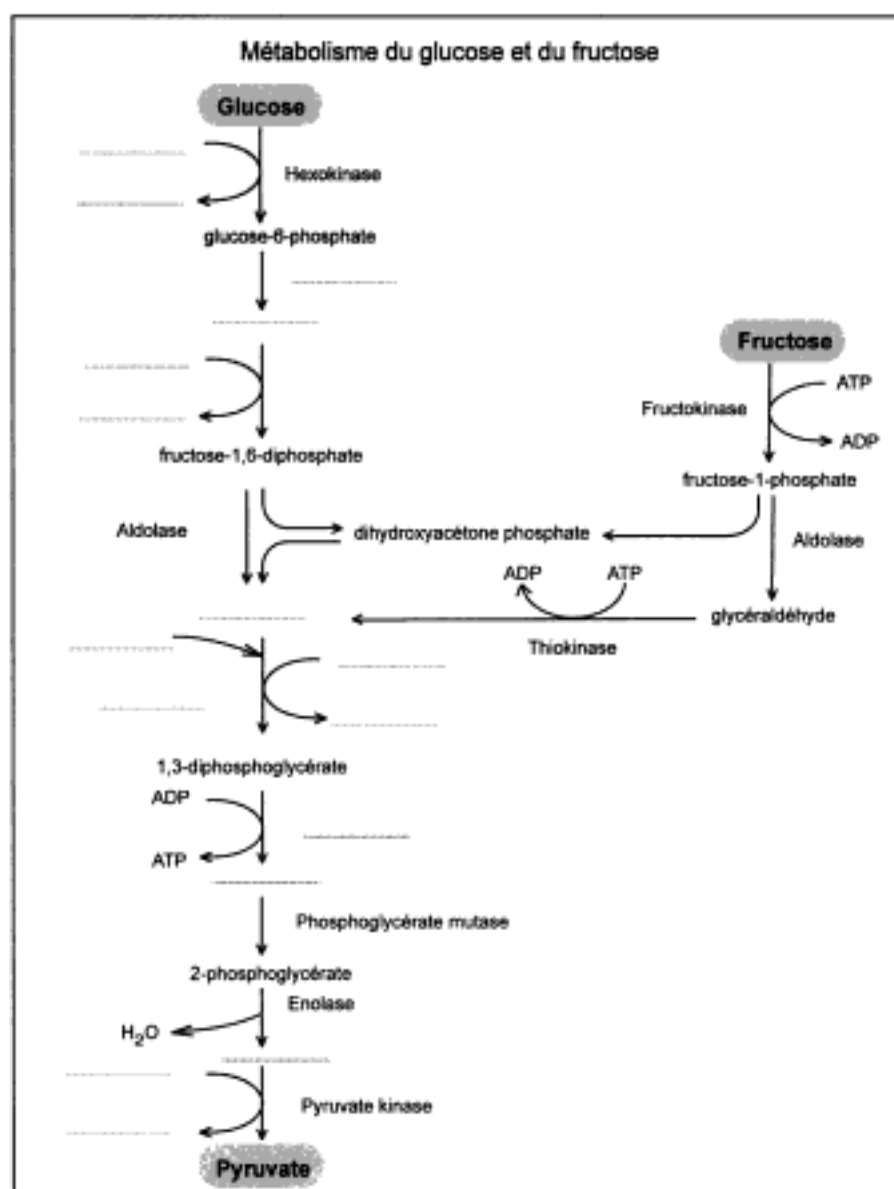
|                                                      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Lactose hydraté en mg dans la prise d'essai          | 14,9 | 15,8 | 16,9 | 17,8 | 18,8 | 19,8 | 20,7 | 21,7 | 22,7 | 23,6 | 24,6 |
| mL de permanganate de K à 0,0200 mol.L <sup>-1</sup> | 3,2  | 3,4  | 3,6  | 3,8  | 4,0  | 4,2  | 4,4  | 4,6  | 4,8  | 5,0  | 5,2  |

**Exercice 15** Dégradation du glucose et du fructose

1. Le glucose et le fructose sont catabolisés selon la succession de réactions présentées dans le schéma " Métabolisme du glucose et du fructose " ci-après.

1.1. Compléter le schéma suivant. Nommer la voie métabolique qui conduit du glucose au pyruvate.





1.2. Nommer et donner la structure schématique du  $\text{NAD}^+$ . Que représente le  $\text{NAD}^+$  pour l'enzyme ? A quelle classe les enzymes à  $\text{NAD}^+$  appartiennent-elles ?

1.3. Etablir et comparer les bilans moléculaires de la dégradation du glucose et du fructose par la voie métabolique étudiée.

2. En aérobiose, le pyruvate obtenu subit une réaction pour donner de l'acétyl-coenzyme A.

2.1. Nommer et écrire l'équation de cette réaction (formules exigées à l'exception des coenzymes).

2.2. L'acétyl-CoA obtenu emprunte la voie du cycle de Krebs où il est dégradé. Les coenzymes réduits formés doivent ensuite être réoxydés dans la cellule. Quelle est la localisation cellulaire précise de cette réoxydation en aérobiose dans les cellules eucaryotes ? Comment s'appelle ce mécanisme ?

### Exercice 16 Métabolisme du pyruvate

Dans les cellules musculaires, le pyruvate est en relation avec d'autres métabolites. Le schéma " Relations du pyruvate avec d'autres métabolites " ci-après présente quelques unes de ces relations.

1. Compléter le schéma et écrire, dans les cadres correspondants, les formules semi-développées demandées.

2. Dans quelle condition les cellules musculaires produisent-elles du lactate ?

3. L'acétyl-CoA peut être dégradé dans le cycle de Krebs.

3.1. Localiser dans la cellule les réactions du cycle de Krebs.

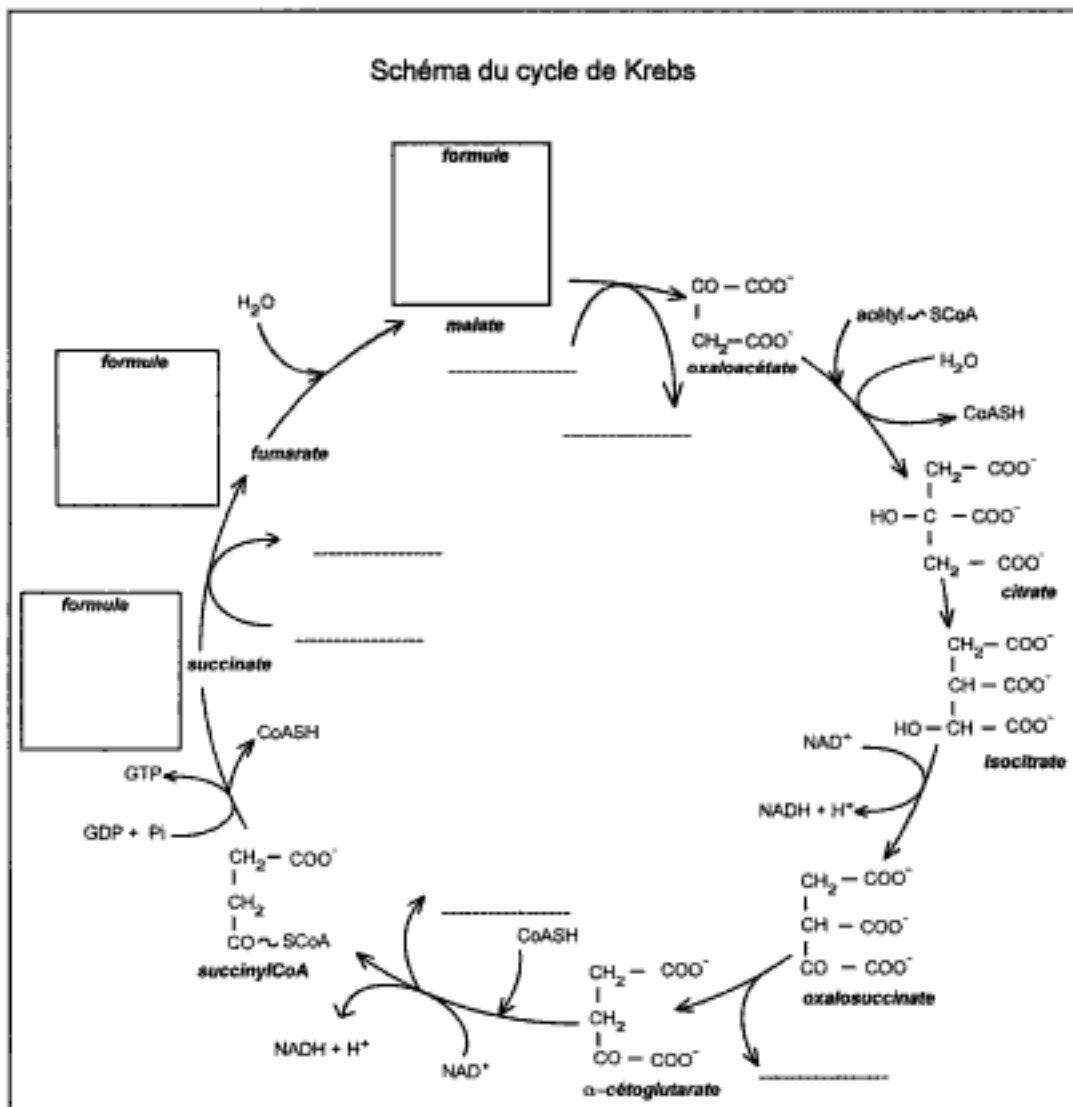
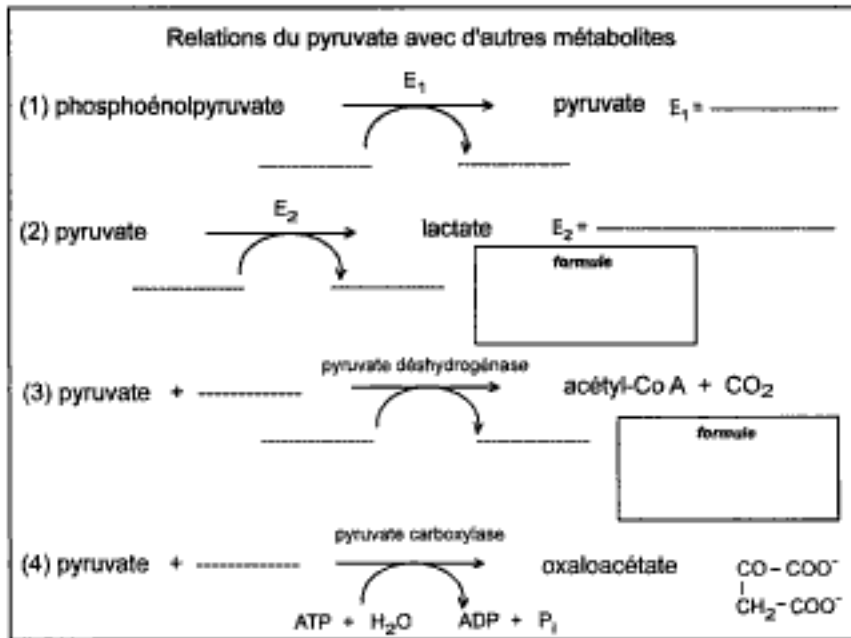
3.2. Compléter le document " Schéma du cycle de Krebs " et écrire, dans les cadres correspondants, les formules semi-développées demandées.

3.3. A partir du document " Schéma du cycle de Krebs ", établir le bilan moléculaire de la dégradation d'une mole d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs.

## 4. Le cycle de Krebs produit des coenzymes réduits.

4.1. Donner le nom et la localisation cellulaire du mécanisme par lequel s'effectue, en aérobiose, la réoxydation des coenzymes.

4.2. Dégager l'importance de ce mécanisme pour la cellule.



**Exercice 17** Fermentation du glucose et production d'alcool éthylique ; métabolisme de l'éthanol**1. Obtention de boissons alcoolisées**

La consommation de boissons alcoolisées (formes primitives de la bière) remonte à la plus haute antiquité : leur obtention ainsi que leur effet physiologique étaient reliés à des pratiques magiques. C'est seulement au XIX<sup>e</sup> siècle que le "principe" actif fut identifié comme ce qui est actuellement appelé éthanol (alcool éthylique  $M = 46 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) de formule brute  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ .

C'est Gay Lussac qui détermina l'équation de transformation de sucre en alcool :



Cette équation permet de déterminer la concentration maximale théorique que l'on peut obtenir par fermentation d'une solution sucrée de concentration donnée.

- 1.1. Calculer la concentration maximale théorique susceptible d'être obtenue par fermentation d'une solution de glucose à  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .
- 1.2. Une mélasse de betterave contenant  $50,0 \text{ g}$  de saccharose par litre, calculer la concentration maximale théorique d'éthanol susceptible d'être obtenue par fermentation.

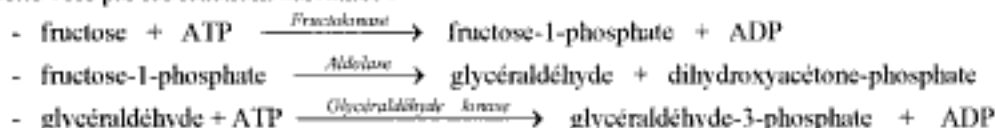
La connaissance de la concentration maximale théorique peut être utilisée pour connaître le rendement de la fermentation du substrat.

- 1.3. La fermentation de la mélasse précédente conduisant à l'obtention de  $25,0 \text{ g}$  d'éthanol par litre de milieu de fermentation, calculer le rendement de la fermentation.
- 1.4. Calculer, sans tenir compte du rendement (en considérant que le rendement est de 100 %), la concentration minimale de saccharose à utiliser pour obtenir, après fermentation, un degré alcoolique de  $5^\circ$  ( $5 \text{ mL}$  d'éthanol pour  $100 \text{ mL}$  de milieu de fermentation ;  $\rho_{\text{éthanol}} = 0,79 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).
- 1.5. Avec le rendement calculé précédemment en 1.3, calculer la concentration minimale de saccharose à utiliser pour obtenir, après fermentation, un degré alcoolique de  $5^\circ$  ( $5 \text{ mL}$  d'éthanol pour  $100 \text{ mL}$  de milieu de fermentation).
- 1.6. Expliquer pourquoi la fermentation de mélasse à la concentration déterminée précédemment ne donnera pas forcément le résultat escompté.

C'est Pasteur qui démontra, à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, que les fermentations étaient le fait de microorganismes telle la levure *Saccharomyces* pour la fermentation alcoolique. A partir du début du XIX<sup>e</sup> siècle commencèrent à être connues les réactions biochimiques – maintenant classiques – responsables d'une telle transformation.

**2. Synthèse de l'éthanol par une levure**

La levure utilise comme substrat des glucides tels que le fructose et le glucose. Le glucose est dégradé par la voie de la glycolyse et le fructose rejoint cette voie par les réactions suivantes :



- 2.1. Écrire les formules (selon Haworth) des glucides suivants :

- $\alpha$ -D-glucopyranose ;
- $\beta$ -D-fructofuranose ;

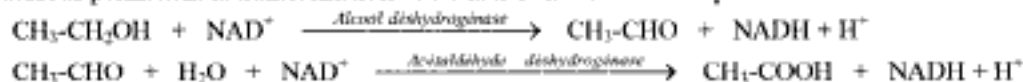
- 2.2. Quelle est la localisation cellulaire de la glycolyse ?

- 2.3. À l'aide du schéma de la glycolyse ci-après et des réactions précédentes, établir et comparer les bilans moléculaires de la dégradation du glucose et du fructose.

- 2.4. Le pyruvate obtenu est réduit en éthanol. Écrire les réactions (formules chimiques exigées, à l'exception des coenzymes) et indiquer l'intérêt de cette étape pour le métabolisme énergétique cellulaire.

**3. Dégradation de l'éthanol au niveau du foie**

Les réactions ci-dessous permettent la transformation de l'éthanol en acide éthanóique :



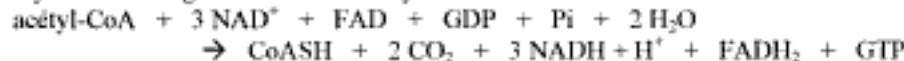
- 3.1. L'acide éthanóique formé est activé en acétyl-CoA suivant la réaction :



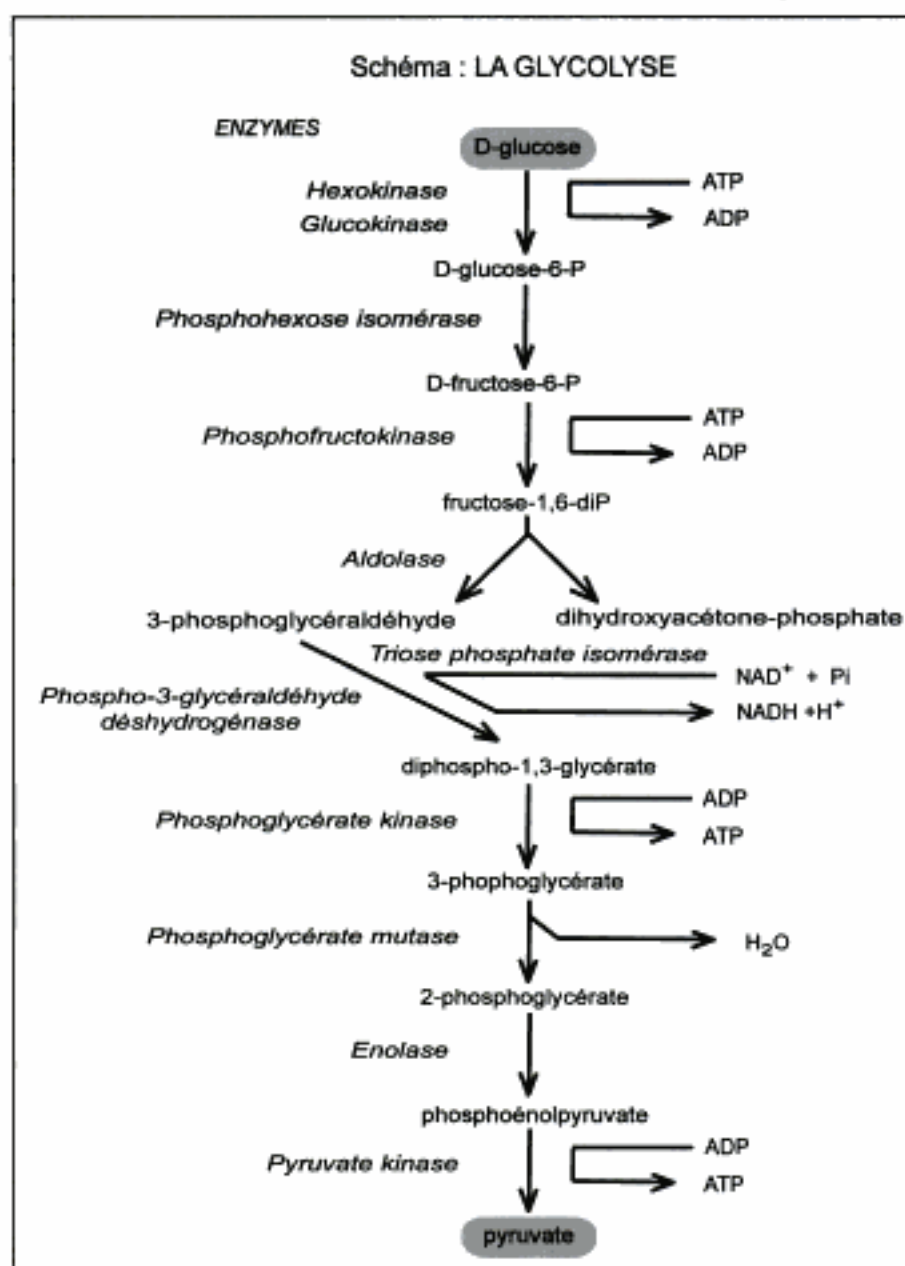
Cette réaction fait intervenir deux composés organiques à haut potentiel d'hydrolyse.

- Citer ces deux composés.
- Représenter et nommer leurs liaisons à haut potentiel d'hydrolyse.

- 3.2. L'acétyl-CoA est dégradé au niveau du cycle de Krebs. Le bilan réactionnel est le suivant :



- Quelle est la localisation cellulaire de cette voie métabolique ?
- Sachant que la réoxydation respiratoire du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  permet la synthèse de 3 ATP et celle du  $\text{FADH}_2$  la synthèse de 2 ATP, établir le bilan énergétique de la dégradation totale d'une mole d'éthanol.



### Exercice 18 Métabolisme du lactate, équation globale d'une chaîne métabolique, localisation sub-cellulaire

#### 1. Oxydation complète du lactate in vivo

Le lactate cytoplasmique est oxydé en pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH). Le pyruvate formé pénètre dans la mitochondrie, subit une décarboxylation oxydative pour donner de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui est dégradé au niveau du cycle de Krebs.

1.1. Ecrire l'équation de la réaction catalysée par la LDH.

1.2. Ecrire l'équation-bilan de la décarboxylation oxydative du pyruvate.

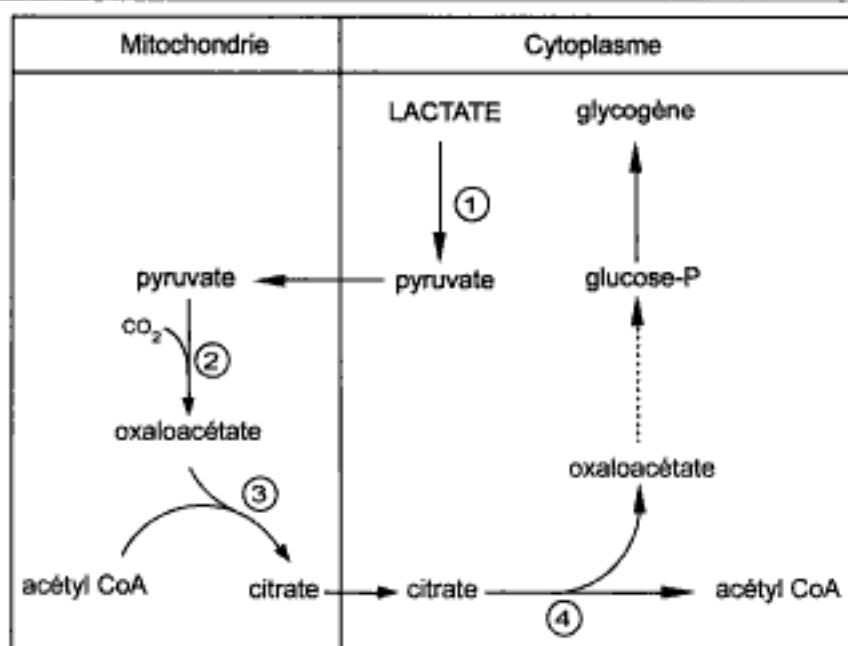
1.3. Ecrire l'équation-bilan d'un tour de cycle de Krebs.

1.4. Ecrire l'équation globale de la dégradation complète du lactate in vivo.

1.5. A l'aide de l'équation globale établie à la question 1.4. et en tenant compte de la réoxydation des coenzymes réduits au niveau de la chaîne respiratoire, calculer le nombre de moles d'ATP synthétisées lors de la dégradation d'une mole de lactate.

#### 2. Néoglucogénèse

Le lactate, produit du catabolisme du glucose, peut donner lieu à une resynthèse de glucose susceptible d'être incorporé dans le glycogène. Une voie métabolique possible est indiquée dans le schéma suivant :



Données :

- équation de la réaction 2 :  $\text{pyruvate} + \text{CO}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{oxaloacétate} + \text{ADP} + \text{P}_i$  (enzyme : pyruvate carboxylase)
- équation de la réaction 4 :  $\text{citrate} + \text{CoA-SH} + \text{ATP} \rightarrow \text{acétyl-CoA} + \text{oxaloacétate} + \text{ADP} + \text{P}_i$  (enzyme : citrate lyase)
- le passage oxaloacétate  $\rightarrow$  glucose, puis glycogène figure sur le schéma simplifié du métabolisme de quelques glucides du résumé du cours.

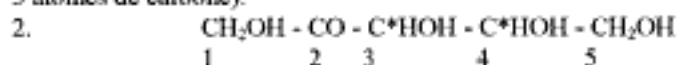
2.1. Évaluer le nombre de moles d'ATP nécessaires à la resynthèse du glucose (6 carbones) incorporé dans du glycogène à partir de 2 moles de lactate (3 carbones).

2.2. L'ensemble des résultats est-il compatible avec l'affirmation rencontrée dans certains ouvrages : le lactate formé en anaérobiose peut régénérer du glucose pour 4/5, le dernier cinquième étant oxydé pour fournir l'énergie nécessaire ?

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Etude d'un glucide

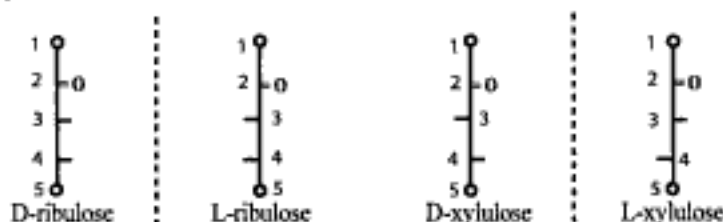
1. Le glucide proposé fait partie de la famille des oses (glucides non hydrolysables), groupe des cétopentoses (fonction cétone en 2 et 5 atomes de carbone).



3. La présence d'un carbone asymétrique entraîne l'existence de 2 isomères. Pour n carbones asymétriques, il y a  $2^n$  isomères.

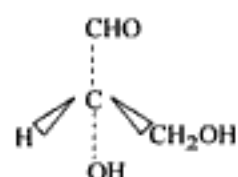
Le composé possède 2 carbones asymétriques, donc  $2^2 = 4$  isomères (les carbones asymétriques sont les carbones 3 et 4, ils sont marqués d'un astérisque).

4. Les différentes structures sont :

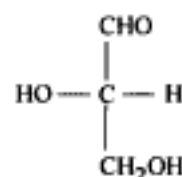
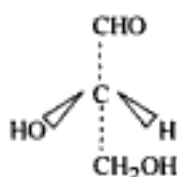


### Exercice 2 Projection de Fischer

Dans la représentation en perspective, le carbone asymétrique doit être saillant, le - CHO étant en haut et le - CH<sub>2</sub>OH en bas. Le composé A s'écrit alors :



Soit en représentation avec la convention de Fischer



Il s'agit du L-glycéraldéhyde.

En procédant de manière identique pour B, C et D, on obtient respectivement le L-glycéraldéhyde, le D-glycéraldéhyde et le D-glycéraldéhyde.

### Exercice 3 Recherche d'épimères

Le nom d'"épimère" est donné à des stéréo-isomères non-énantiomères ne différant que par la configuration d'un C\*.

D'après le tableau de la filiation des oses :

- les couples d'épimères en C<sub>2</sub> sont : D-xylose et D-lyxose, D-glucose et D-mannose, D-galactose et D-talose ;
- les couples d'épimères en C<sub>3</sub> sont : D-ribose et D-xylose, D-gulose et D-galactose ;
- les couples d'épimères en C<sub>4</sub> sont : D-glucose et D-galactose, D-mannose et D-talose.

Il en va de même pour les oses de la série L.

### Exercice 4 Rhamnose et fucose

La structure du D-mannose est donnée dans le tableau de filiation des oses. Celle du L-mannose est son image dans un miroir. La structure du L-rhamnose se déduit facilement de celle du L-mannose, le carbone 6 ne porte pas de fonction hydroxyle (- OH).

Le L-rhamnose possède 4 carbones asymétriques, donc  $2^4 = 16$  isomères (ou  $2^4 - 1 = 15$  isomères si on compte déjà le L-rhamnose). Le fucose est un stéréo-isomère du rhamnose.

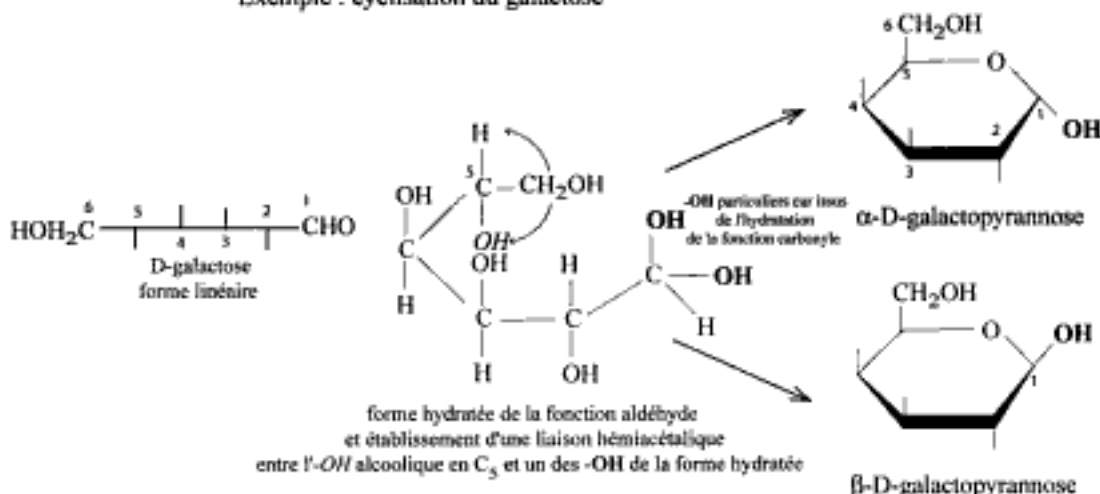


**Exercice 5 Formule cyclique du galactopyranose**

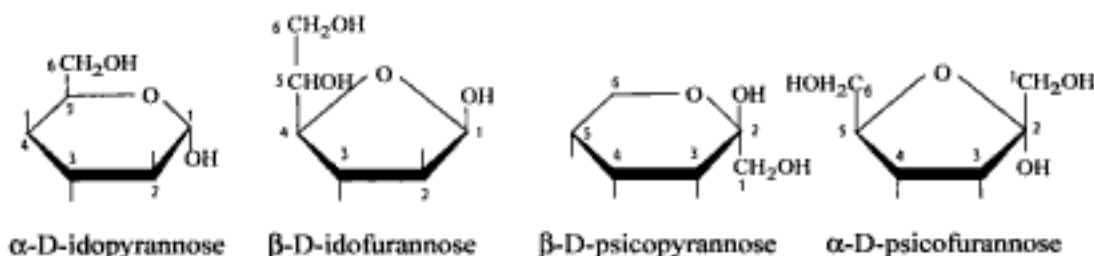
Les règles d'après lesquelles Haworth représente les oses sont les suivantes :

- un hémiacétal cyclique à 5 éléments est appelé furannose ; celui à 6 éléments est appelé pyranose ;
- le plan équatorial du cycle est horizontal et perpendiculaire à la feuille ;
- les substituants (-OH et -H) se trouvant à droite dans les projections linéaires de Fischer sont dirigés vers le bas, les substituants orientés vers la gauche sont dirigés vers le haut ;
- dans la série D, l'hydroxyle hémiacétalique (-OH) de l'anomère  $\alpha$  est au-dessous du plan du cycle, c'est-à-dire en position trans par rapport au  $\text{CH}_2\text{OH}$  substituant du  $\text{C}_5$ , celui de l'anomère  $\beta$  est au-dessus du plan du cycle ;
- en outre, certains usages veulent que l'on ne fasse figurer ni les carbones, ni les H ; les hydroxyles sont alors visualisés par un tiret vertical, à l'exception de l'hydroxyle hémiacétalique qui peut rester visualisé.

Exemple : cyclisation du galactose



**Exercice 6 Passage de formes linéaires à des formes cycliques**



**Exercice 7 Calcul du pouvoir rotatoire d'une solution de fructose**

Le pouvoir rotatoire d'une solution optiquement active (ici, une solution de fructose) est donné par la loi de Biot :

$$\alpha = [\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} \cdot l \cdot C$$

Avec :  $\alpha$  : pouvoir rotatoire (en degré)

$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$  : pouvoir rotatoire spécifique (pouvoir rotatoire à  $20^\circ\text{C}$  d'une solution optiquement active ayant une concentration unité ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ou en  $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) mesuré dans un tube polarimétrique de longueur unité (dm) pour la raie D du sodium)

En utilisant les valeurs numériques proposées, on obtient :

$$\alpha = -92,5 \cdot (20 \cdot 10^{-1}) \cdot (0,50 \cdot 180 \cdot 10^{-3})$$

$$\alpha = -16,65^\circ = -16^\circ 39'$$

**Exercice 8** Polarimétrie : pouvoir rotatoire

1. La forme commerciale du glucose solide est la forme  $\alpha$ -D-glucopyranose de pouvoir rotatoire spécifique élevé. Mis en solution, ce glucose va partiellement s'isomériser, via la forme linéaire (ouverture du cycle hémiacétalique et « refermeture », pour donner la configuration opposée autour du carbone anomérique), en forme  $\beta$  de pouvoir rotatoire spécifique plus faible. Le pouvoir rotatoire de la solution diminue donc jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint, ceci au bout d'un certain temps. C'est le phénomène de la mutarotation. Ce phénomène est donc dû à l'interconversion des formes anomériques  $\alpha$  et  $\beta$ .

2. Soit respectivement  $x$  et  $y$  les concentrations massiques d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -D-glucopyranose exprimée en  $\text{g.mL}^{-1}$ .

- Quand l'équilibre entre les deux formes est atteint, pour une solution de glucose à  $1 \text{ g.mL}^{-1}$ , on peut écrire :

$$x + y = 1 \quad (\text{équation 1})$$

- Le pouvoir rotatoire de cette solution de glucose à l'équilibre est :

$$\alpha = 52,7 \cdot (x + y) \cdot l \quad (l \text{ étant la longueur en dm du trajet lumineux à travers la solution}).$$

Or, le pouvoir rotatoire d'une solution renfermant plusieurs substances optiquement actives est égal à la somme algébrique des pouvoirs rotatoires revenant à chaque constituant. Si  $\alpha_1$  est le pouvoir rotatoire attribuable à l' $\alpha$ -D-glucopyranose et  $\alpha_2$  celui attribuable au  $\beta$ -D-glucopyranose, on a :

$$\alpha = \alpha_1 + \alpha_2 \quad \text{avec } \alpha_1 = 112,2 \cdot x \cdot l \text{ et } \alpha_2 = 18,7 \cdot y \cdot l$$

$$\text{c'est-à-dire : } 52,7 \cdot (x + y) \cdot l = 112,2 \cdot x \cdot l + 18,7 \cdot y \cdot l \quad (\text{équation 2})$$

En remplaçant dans (2)  $y$  par  $(1 - x)$  tiré de (1), on obtient :

$$52,7 = 112,2 \cdot x + 18,7 \cdot (1 - x)$$

$$52,7 = x \cdot (112,2 - 18,7) + 18,7$$

$$x = (52,7 - 18,7) / (112,2 - 18,7)$$

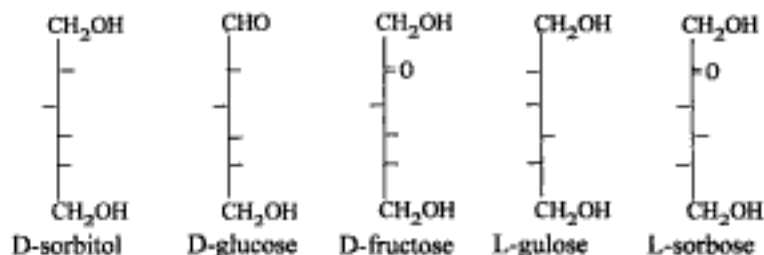
$$\text{d'où } x = 0,364 \text{ et } y = 0,636.$$

La solution contient à l'équilibre 36,4 % de forme  $\alpha$  et 63,6 % de forme  $\beta$ .

**Exercice 9** Réduction des oses

Le sorbitol peut être obtenu par :

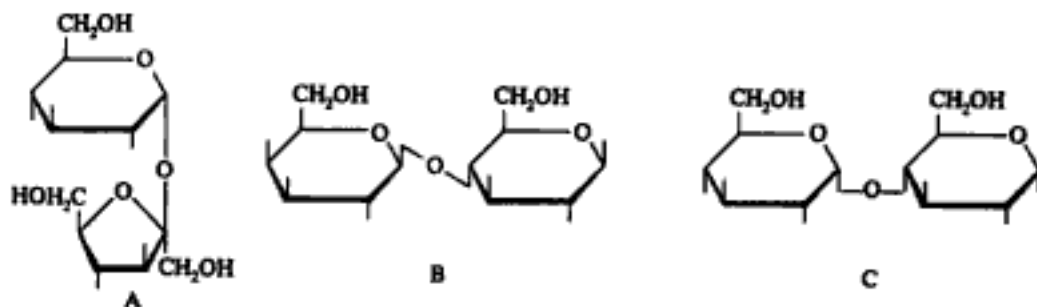
- réduction du D-glucose ou du D-fructose ;
- réduction du L-gulose (aldohexose) ;
- réduction du L-sorbose (cétohexose).



Remarque : la réduction du D-fructose et du L-sorbose conduit à chaque fois à deux polyols isomères. Seul l'un de ces isomères correspond au sorbitol.

**Exercice 10** Structure et propriétés des diholosides

1. Les glucides à identifier sont respectivement: A = saccharose, B = anomère  $\beta$  du lactose, C = anomère  $\alpha$  du maltose.
2. Compte tenu des règles de Haworth, les formules des composés A, B et C sont :





## 3. Propriétés s'expliquant par la liaison osidique

**Pouvoir réducteur** : si la liaison est engagée entre les deux carbones anomériques (cas du diholoside A), le diholoside est non réducteur. Si la liaison osidique est engagée entre le carbone anomérique du premier ose et un carbone non anomérique de l'autre (cas de B et C), le diholoside est réducteur.

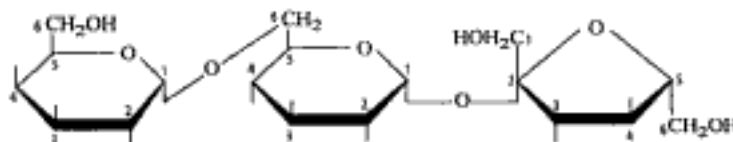
**Méthylation** : la méthylation de A ne donne que des liaisons éther entre les groupements méthyle et les groupements hydroxyle libres. Pour B et C, il y a en plus formation d'une liaison hémicétabique avec le groupement hydroxyle du carbone anomérique de l'extrémité réductrice.

## 4. La méthylation de :

- A donne le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-1,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\beta$ -D-fructofuranoside ;
  - B donne le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-2,3,6-tri-O-méthyl-1-méthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ;
  - C donne le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-2,3,6-tri-O-méthyl-1-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside.
- Les composés précédents, par hydrolyse douce, donnent respectivement :
- le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose et le 1,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\beta$ -D-fructofuranose pour A ;
  - le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\beta$ -D-galactopyranose et le 2,3,6-tri-O-méthyl- $\beta$ -D-glucopyranose pour B ;
  - le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose et le 2,3,6-tri-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose pour C.

**Exercice 11** Structure et propriétés d'un triholoside : le raffinose

1. Afin de pouvoir définir la nature des oses constitutifs et de préciser leurs liaisons, il est utile de réécrire la structure du raffinose, en numérotant les atomes de carbone des divers constituants.



Les oses constitutifs sont respectivement le galactose, le glucose et le fructose. Les liaisons osidiques sont de type  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) et  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  2). Le raffinose est donc l' $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1  $\rightarrow$  6) -  $\alpha$ -D-glucopyranosyl - (1  $\rightarrow$  2) -  $\beta$ -D-fructofuranoside.

2. Le raffinose fait partie des triholosides non réducteurs. En effet, chaque ose constitutif engage sa liaison réductrice (carbonylée) dans une liaison osidique.

3. Ce triholoside n'est pas réducteur ; il ne réagit donc pas avec la liqueur de Fehling, sauf hydrolyse préalable.

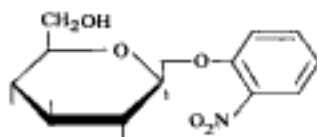
4. Sa solution fraîche ne présente pas de phénomène de mutarotation, les fonctions réductrices des oses constitutifs étant, comme on vient de le voir, engagées dans des liaisons osidiques.

**Exercice 12** Structure et propriétés d'un hétéroside : l'ONPG

1. Un hétéroside résulte de la combinaison d'un hydroxyle issu de l'hydratation du groupement carbonyle d'un ose ou d'un oligoside avec une fraction non glucidique appelée aglycone.

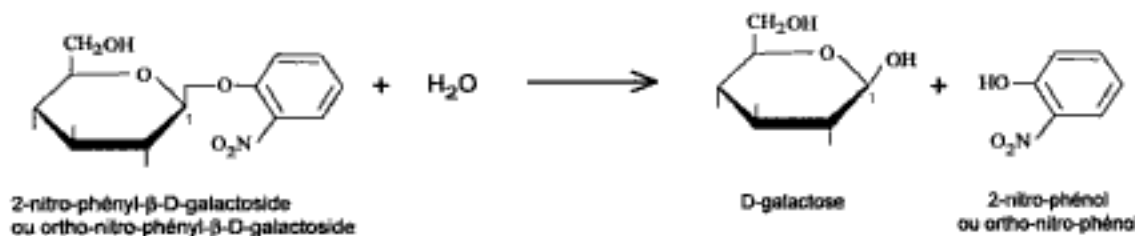
## 2. Structure de l'ONPG

L'ONPG (l'ortho-nitro-phényl- $\beta$ -D-galactoside) est un O-hétéroside, ce qui signifie que la liaison osidique met en jeu, formellement, l'hydroxyle hémicétabique (carbonyle) du sucre réducteur et l'hydroxyle phénolique de l'ONP. La structure est donc la suivante :



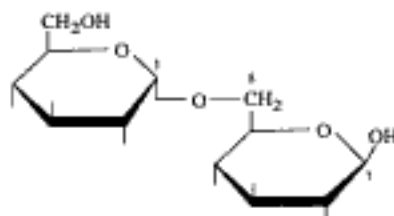
2-nitro-phényl- $\beta$ -D-galactoside  
ou ortho-nitro-phényl- $\beta$ -D-galactoside

3. La réaction d'hydrolyse est la suivante :



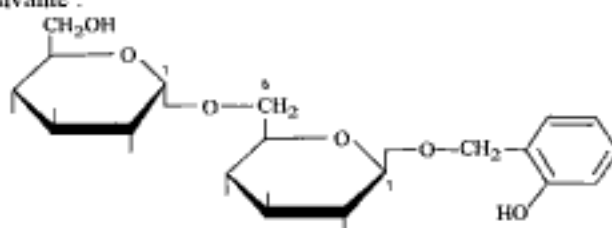
**Exercice 13** Détermination de la structure d'un hétéroside après méthylation et hydrolyse

1. Un hétéroside résulte de la combinaison d'un hydroxyle issu de l'hydratation du groupement carbonyle d'un ose ou d'un oligoside avec une fraction non glucidique appelée aglycone.
2. La formule du diboloside est la suivante :



Ce diboloside ayant un hydroxyle hémicéталique libre est réducteur.

3. La formule de l'hétéroside est la suivante :

**Exercice 14** Dosage d'un mélange glucose-lactose

1. Dosage du glucose

L'équation de la droite d'étalonnage est :  $A = 0,04457 \cdot q$  ( $\mu\text{g}$  de glucose par tube) + 0 avec  $r = 1,0000$ .

Le mélange à doser dilué au 1/100 donne une absorbance de 0,690 pour une prise d'essai de 0,2 mL. Cela correspond à 15,5  $\mu\text{g}$  de glucose dans la prise d'essai. La concentration massique en glucose  $\rho$  dans le mélange est donc de :

$$\rho = \frac{15,5 \cdot 10^{-6} \cdot 100}{0,2 \cdot 10^{-3}} = 7,75 \text{ g.L}^{-1}$$

2. Dosage du pouvoir réducteur

2.1. Calcul des volumes de solution de permanganate de potassium nécessaires au dosage du pouvoir réducteur du glucose et du lactose.

La quantité de glucose dans les 4 mL de prise d'essai est de :  $4 \cdot 7,75 = 31$  mg, ce qui correspond à 958  $\mu\text{mol}$  d'électrons (voir l'extrait de la table de Bertrand pour le glucose présente dans l'énoncé).

Le volume  $v$  de solution de permanganate de potassium correspondant est obtenu à partir de l'équation :

$$5 \cdot 0,02 \cdot v = 958, \quad \text{d'où } v = 9,58 \text{ mL.}$$

Remarque : le facteur 5 provient du fait qu'une mole de permanganate de potassium en solution libère 5 moles d'électrons lors de la réaction d'oxydo-réduction :



Le volume  $v'$  de solution de permanganate de potassium nécessaire au dosage du pouvoir réducteur du lactose est donc de  $13,55 - 9,58 = 3,97$  mL.

2.2. Calcul de la concentration massique du lactose dans le mélange

La masse de lactose hydraté dans le mélange est donnée par interpolation dans l'extrait de la table de Bertrand pour le lactose, soit

$$17,8 + (18,8 - 17,8) \cdot (3,97 - 3,8) / 0,2 = 18,65 \text{ mg de lactose hydraté pour une prise d'essai de 4 mL.}$$

ou encore une concentration massique de  $18,65 / 4 = 4,66 \text{ g.L}^{-1}$ .

Remarque : la table de Bertrand peut être remplacée par une formule polynomiale permettant à la fois une bonne approximation et un traitement informatique aisé.

Soient  $e_{\text{GR}}$  le nombre de  $\mu\text{mol}$  d'électrons libérés par le glucide réducteur (ou d'ions cuivreux formés) et  $n_{\text{GR}}$  le nombre de  $\mu\text{mol}$  de glucide réducteur dans la prise d'essai,  $e_{\text{GR}}$  est lié à  $n_{\text{GR}}$  par la relation :

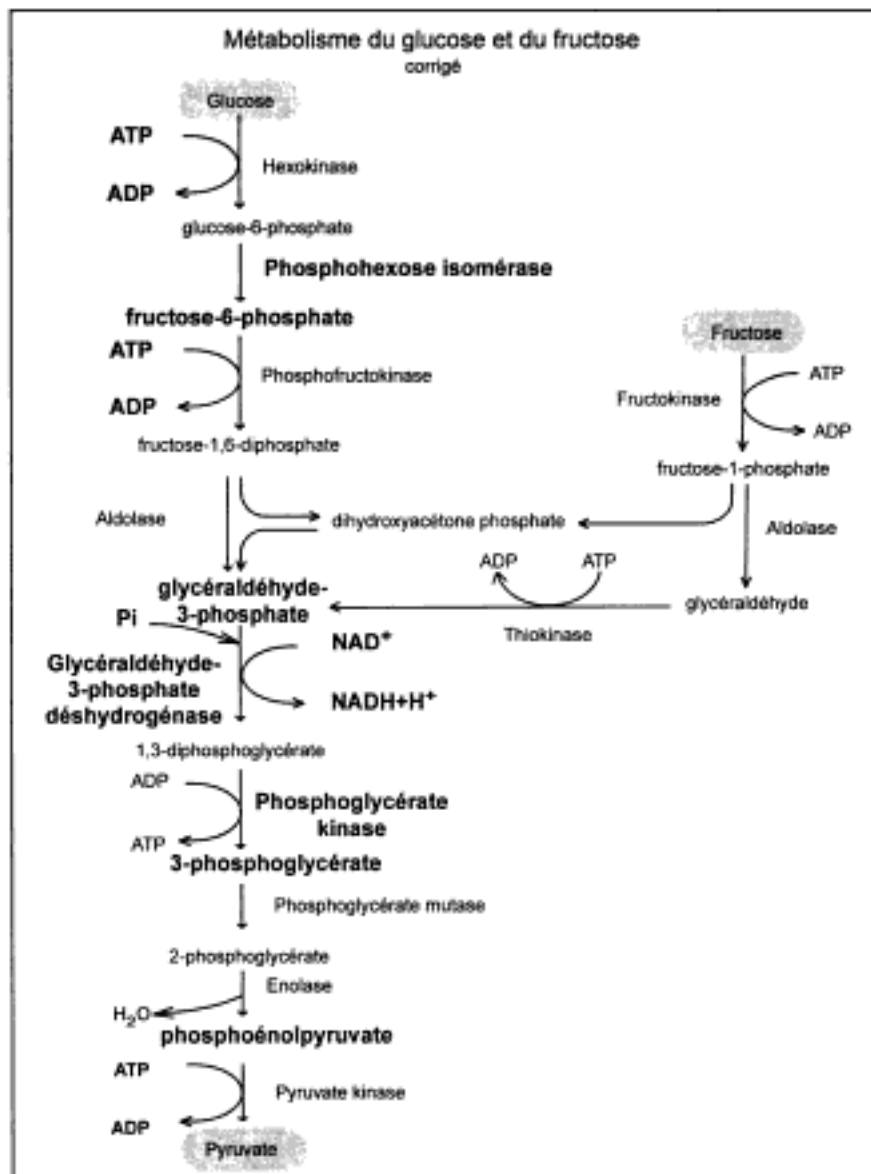
$$n_{\text{GR}} = a \cdot e_{\text{GR}}^2 + b \cdot e_{\text{GR}} + c$$

avec, pour le glucose,  $a = 1,0624 \cdot 10^{-5}$ ,  $b = 0,16816$  et  $c = 0,76082$  si  $e_{\text{GR}}$  appartient à l'intervalle [347-2802]  $\mu\text{mol}$  et, pour le lactose,  $a = 5,116 \cdot 10^{-6}$ ,  $b = 0,1313$  et  $c = -1,34$  si  $e_{\text{GR}}$  appartient à l'intervalle [320-2060]  $\mu\text{mol}$ .

**Exercice 15** Dégradation du glucose et du fructose

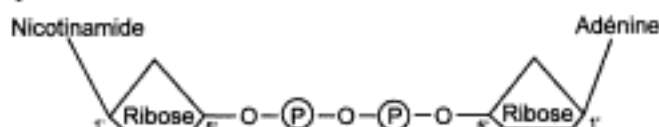
## 1. Métabolisme du glucose et du fructose

1.1. La voie métabolique étudiée est la glycolyse. Pour les formules, voir le schéma "Métabolisme du glucose et du fructose" ci-après.



1.2. -  $\text{NAD}^+$  = Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)

- Structure schématique du  $\text{NAD}^+$



- Le  $\text{NAD}^+$  est un cofacteur pour l'enzyme ; plus particulièrement, il s'agit d'un cosubstrat.

- Ces enzymes appartiennent à la classe des oxydoréductases.

1.3. Bilans moléculaires de la glycolyse du glucose et du fructose

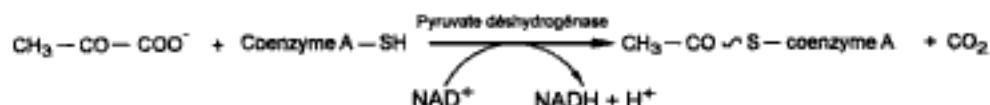
- glucose + 2 ADP + 2 Pi + 2  $\text{NAD}^+$   $\rightarrow$  2 pyruvate + 2 ATP + 2 NADH +  $\text{H}^+$  + 2  $\text{H}_2\text{O}$

- fructose + 2 ADP + 2 Pi + 2  $\text{NAD}^+$   $\rightarrow$  2 pyruvate + 2 ATP + 2 NADH +  $\text{H}^+$  + 2  $\text{H}_2\text{O}$

Ces bilans moléculaires sont identiques au substrat de départ près.

## 2. Formation aérobie d'acétyl-coenzyme A

## 2.1. Décarboxylation oxydative du pyruvate

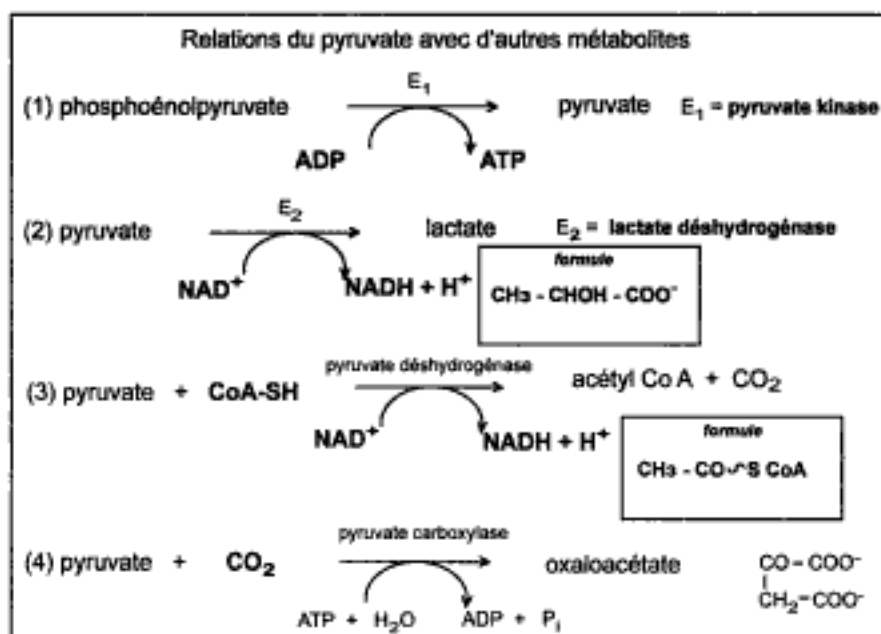


## 2.2. Réoxydation des coenzymes réduits suite à dégradation de l'acétyl-coenzyme A dans le cycle de Krebs

- La réoxydation des coenzymes réduits s'effectue au niveau de la membrane interne mitochondriale dans les cellules eucaryotes.
- Ce mécanisme de transfert de pouvoir réducteur conduisant la production d'ATP s'appelle la chaîne respiratoire.

**Exercice 16** Métabolisme du pyruvate

## 1. Voir schéma ci-dessous :



2. Le lactate est produit en anaérobiose (par exemple, chez l'homme, lors d'un effort physique intensif).

3. L'acétyl-CoA peut être dégradé dans le cycle de Krebs.

3.1. Le cycle de Krebs a lieu dans la matrice mitochondriale.

3.2. Voir à la page suivante le schéma du cycle de Krebs.

3.3. Bilan moléculaire de la dégradation d'une mole d'acétyl-CoA :

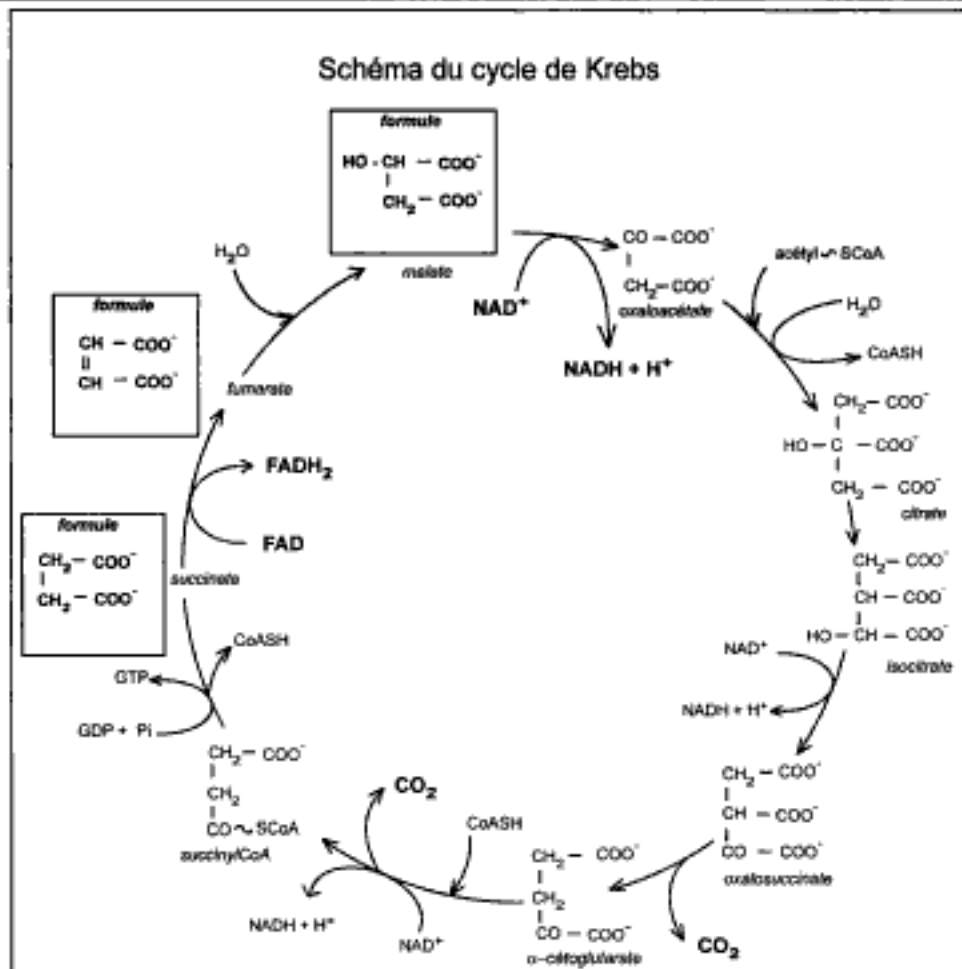


4. Les coenzymes réduits

4.1. La réoxydation des coenzymes réduits s'effectue au niveau de la chaîne respiratoire ; celle-ci est localisée dans la membrane interne mitochondriale des cellules eucaryotes.

4.2. L'importance de ce mécanisme pour la cellule est double :

- régénérer le stock de coenzymes d'oxydo-réduction (NAD<sup>+</sup> et FAD) sous forme oxydée ;
- produire de l'énergie utilisable pour la cellule, sous forme d'ATP (la réoxydation respiratoire du NADH + H<sup>+</sup> permet la synthèse de 3 ATP et celle du FADH<sub>2</sub> la synthèse de 2 ATP).

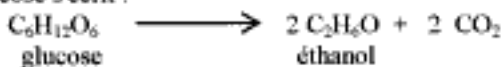


**Exercice 17 Fermentation du glucose et production d'alcool ; métabolisme de l'éthanol**

**1. Obtention de boissons alcoolisées**

1.1. Calcul de la concentration maximale théorique susceptible d'être obtenue par fermentation d'une solution de glucose à 100 g.L<sup>-1</sup>

La réaction de dégradation du glucose s'écrit :



soit à 180 g correspondent 2 . 46 g

Ainsi, une solution de glucose après fermentation permet donc, en théorie, d'obtenir :

$$\rho_{\text{éthanol théorique glucose}} = \frac{100}{180} \cdot 2 \cdot 46 = 51,1 \text{ g d'éthanol.L}^{-1}$$

1.2. Calcul de la concentration maximale théorique susceptible d'être obtenue par fermentation d'une mélasse de betterave à 50 g de saccharose . L<sup>-1</sup>

La dégradation du saccharose conduit, par hydrolyse, à la formation d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. La dégradation du fructose se fait par intégration au métabolisme du glucose (action de l'aldolase sur le fructose-1-phosphate) :

Ainsi, une mélasse à 50 g de saccharose par litre permet, après fermentation, en théorie, d'obtenir :

$$\rho_{\text{éthanol théorique mélasse}} = \frac{50}{342} \cdot 2 \cdot 46 = 26,9 \text{ g d'éthanol.L}^{-1}$$

1.3. Calcul du rendement de fermentation d'une mélasse de betterave à 50 g de saccharose . L<sup>-1</sup>

A un rendement de 100 % correspond l'obtention d'une concentration de 26,9 g d'éthanol . L<sup>-1</sup>.

A une concentration de 25,0 g d'éthanol . L<sup>-1</sup> correspond un rendement R de :

$$R = \frac{25,0}{26,9} \cdot 100 = 92,9 \%$$

1.4. Calcul de la concentration minimale de saccharose à utiliser pour obtenir un degré alcoolique de 5°

A un degré alcoolique de 5° correspond une concentration de 50 mL d'alcool éthylique par litre soit :

$$\rho_{\text{éthanol } 5^\circ} = 50 \cdot 0,79 \text{ g . L}^{-1} = 39,5 \text{ g éthanol.L}^{-1}$$

$$\text{soit } C_{\text{éthanol } 5^\circ} = \frac{39,5}{46} = 0,859 \text{ mol éthanol.L}^{-1}$$

Ces 0,859 mol éthanol.L<sup>-1</sup> correspondent à la dégradation de  $\frac{0,850}{2 \cdot 2}$  mol de saccharose soit p g de saccharose.L<sup>-1</sup>

$$p_{\text{saccharose théorique}} = 73,4 \text{ g.L}^{-1}$$

1.5. Calcul de la concentration minimale de saccharose à utiliser pour obtenir un degré alcoolique de 5° compte tenu du rendement

$$p_{\text{saccharose théorique}} = \frac{73,4}{0,929} = 79,0 \text{ g saccharose.L}^{-1}$$

Remarque : le résultat précédent aurait pu être également obtenu en remarquant qu'une solution de saccharose à 50 g . L<sup>-1</sup> correspond à une concentration en éthanol à 25,0 g d'éthanol . L<sup>-1</sup> ; pour obtenir une solution à 39,5 g éthanol . L<sup>-1</sup>, il faut partir de :

$$p_{\text{saccharose théorique}} = \frac{39,5}{25,0} \cdot 50 = 79,0 \text{ g saccharose.L}^{-1}$$

1.6. Raisons susceptibles d'expliquer la non-concordance des résultats expérimentaux avec ceux escomptés :

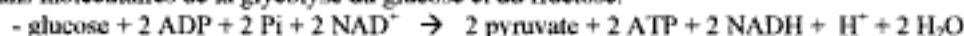
- qualité de la mélasse utilisée (présence d'inhibiteurs ou de " poisons " toxiques pour les organismes fermentaires) ;
- variabilité des conditions de fermentation (souche de levure, paramètres physico-chimiques).

## 2. Synthèse de l'éthanol par une levure

2.1. Formules (selon Haworth) de l'α-D-glucopyranose et du β-D-fructofurannose, voir paragraphe " Principaux oses et diholosides ".

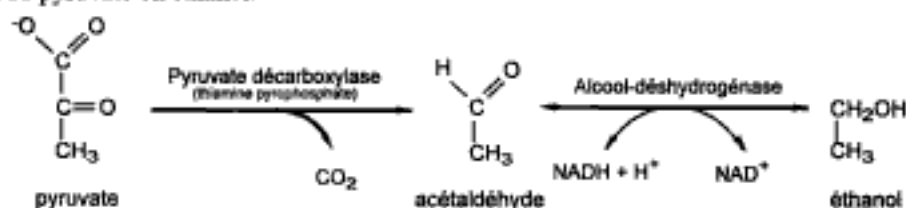
2.2. La glycolyse a lieu dans le cytosol de la cellule.

2.3. Bilans moléculaires de la glycolyse du glucose et du fructose.



Ces bilans moléculaires sont identiques au substrat de départ près.

2.4. Réduction du pyruvate en éthanol.



L'intérêt de cette étape pour le métabolisme énergétique cellulaire est la réoxydation, en anaérobiose, des coenzymes réduits.

## 3. Dégradation de l'éthanol au niveau du foie

3.1. La réaction fait intervenir deux composés organiques à haut potentiel d'hydrolyse : l'ATP (adénosine triphosphate) et l'acétyl-CoA.

- ATP : Adénine - Ribose - O - (P) - O ~ (P) - O ~ (P) : anhydride d'acide

- Acétyl-CoA : CH<sub>3</sub> - CO ~ S CoA : thioester

3.2. Cycle de Krebs

- Le cycle de Krebs a lieu dans la matrice des mitochondries des cellules eucaryotes.

- Bilan énergétique de la dégradation totale d'une mole d'éthanol :

- 17 molécules d'ATP produites par molécule d'éthanol si l'on considère que la transformation de l'acide éthanoïque en acétyl-CoA " consomme " une molécule d'ATP ;

- 16 molécules d'ATP produites par molécule d'éthanol si l'on considère que la transformation de l'acide éthanoïque en acétyl-CoA " consomme " deux équivalences énergétiques (une molécule d'ATP est transformée en AMP lors de cette réaction).

## Exercice 18 Métabolisme du lactate, équation globale d'une chaîne métabolique, localisation sub-cellulaire

### 1. Oxydation complète du lactate in vivo

1.1. Réaction catalysée par la LDH :



1.2. Equation-bilan de la décarboxylation oxydative du pyruvate :



1.3. Equation-bilan d'un tour de cycle de Krebs :



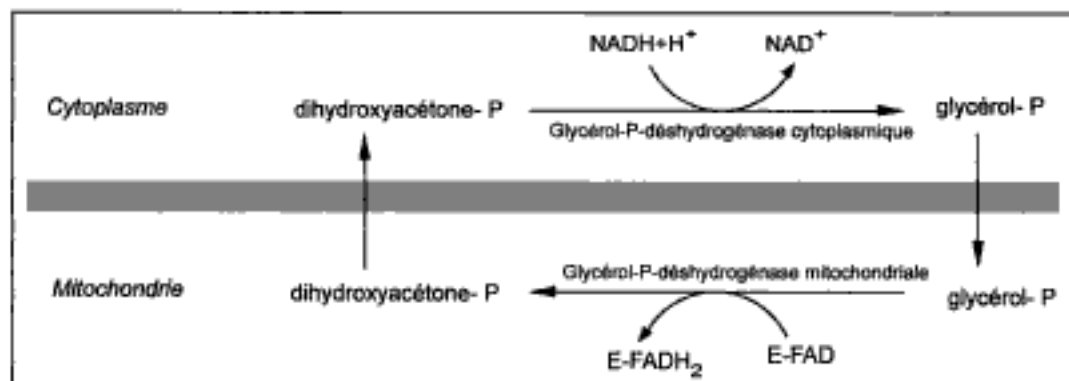
1.4. Equation globale de la dégradation complète du lactate in vivo :



1.5. Bilan en ATP : la réoxydation de NADH donne 3 ATP, celle de FADH<sub>2</sub> en donne 2 et le GTP est équivalent à l'ATP.

Cela donne en tout 5 . 3 + 2 + 1 = 18 ATP par mole de lactate

Remarque : le NADH cytoplasmique ne traverse pas la double membrane mitochondriale. Le "pouvoir réducteur" véhiculé par ce coenzyme peut néanmoins se retrouver dans la mitochondrie en empruntant la navette du glycérol-phosphate (voir ci-dessous) ou la navette malate / aspartate.



La glycérol-P-déshydrogénase mitochondriale étant une enzyme à FAD, le rendement en ATP n'est plus que de 2 ATP au lieu de 3 dans le cas d'enzyme à NAD.

Par contre, dans le cas de la navette du malate / aspartate, la malate déshydrogénase mitochondriale est une enzyme à NAD et la réoxydation de NADH donne les 3 ATP habituels.

Selon la voie prise en considération, le bilan en ATP sera donc différent.

## 2. Néoglucogenèse

2.1. Evaluation du nombre de moles d'ATP nécessaires à la resynthèse du glucose à partir de 2 moles de lactate

Pour resynthétiser une mole de glucose, il faut, pour 2 moles de lactate :

|                                                                                                         |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Réaction 2                                                                                              | 2 ATP         |
| Réaction 4                                                                                              | 2 ATP         |
| Passage de l'oxaloacétate au phosphoénol pyruvate                                                       | 2 ITP = 2 ATP |
| Transformation du 3-phospho-glycérate en 1,3-diphosphoglycérate                                         | 2 ATP         |
| Incorporation du glucose-P dans le glycogène : UDP-glucose, ce qui nécessite une mole d'ATP par glucose | 1 ATP         |
| Total                                                                                                   | 9 ATP         |

9 moles d'ATP sont utilisées pour 2 moles de lactate, soit 4,5 moles par mole de lactate.

2.2. L'oxydation complète *in vivo* d'une mole de lactate donne 18 moles d'ATP. L'énergie produite permet, lors de la néoglucogenèse, la transformation de 4 autres moles de lactate en glucose dans le glycogène ( $4 \cdot 4,5 = 18$  ATP).

Donc, à partir de 5 moles de lactate, 4 se retrouvent dans le glycogène, la dégradation de la cinquième fournissant l'énergie nécessaire.

## 3 - Lipides

### 1. Structure et propriétés

#### 1.1. Définition

Famille de composés hétérogènes caractérisés, en général, par leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques.

#### 1.2. Les acides gras

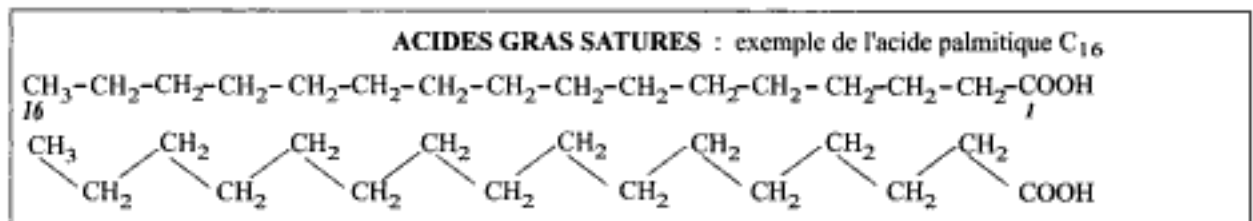
##### 1.2.1. Nomenclature

- chimique : acides gras saturés  $C_n$  exemple :  $C_{18}$   
acides gras désaturés (insaturés ou éthéniques)  $C_n : x \Delta^y$  exemple :  $C_{18} : 2 \Delta^{9,12}$
- filiative (uniquement pour les acides gras désaturés)  $n : x \omega y'$  exemple :  $C_{18} : 2 \Delta^{9,12}$  devient  $18 : 2 \omega 6$   
(avec : - n, nombre d'atomes de carbone ;  
- x, nombre de doubles liaisons ( $\Delta$ ) ;  
- y, position de(s) double(s) liaison(s) lorsque la numérotation se fait à partir du - COOH terminal ;  
- y', position de la première double liaison rencontrée lorsque la numérotation se fait à partir du  $C\omega$  terminal (-  $CH_3$ ).

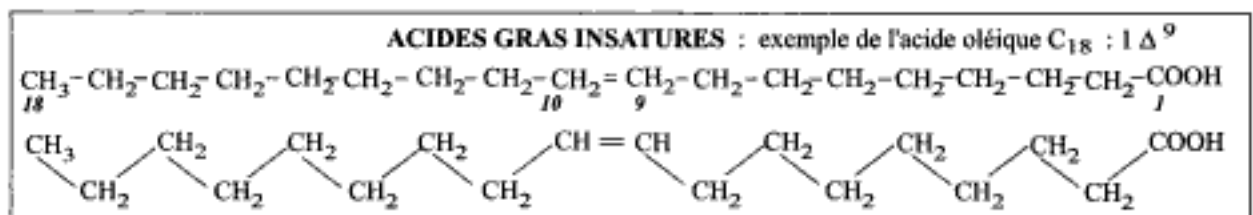
##### 1.2.2. Définition

Acides carboxyliques, à nombre d'atomes de carbone généralement pair et supérieur ou égal à 4, non ramifiés, saturés ou insaturés.

##### 1.2.3. Principaux acides gras



|          |                                            |          |                                              |
|----------|--------------------------------------------|----------|----------------------------------------------|
| $C_4$    | acide n-butanoïque (acide butyrique)       | $C_{16}$ | acide n-hexadécanoïque (acide palmitique)    |
| $C_6$    | acide n-hexanoïque (acide caproïque)       | $C_{18}$ | acide n-octadécanoïque (acide stéarique)     |
| $C_8$    | acide n-octanoïque (acide caprylique)      | $C_{20}$ | acide n-éicosanoïque (acide arachidique)     |
| $C_{10}$ | acide n-décanoïque (acide caprique)        | $C_{22}$ | acide n-docosanoïque (acide béhénique)       |
| $C_{12}$ | acide n-dodécanoïque (acide laurique)      | $C_{24}$ | acide n-tétracosanoïque (acide lignocérique) |
| $C_{14}$ | acide n-tétradécanoïque (acide myristique) |          |                                              |



|                                            |                     |                                                         |                     |
|--------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------|---------------------|
| $C_{16} : 1 \Delta^9$ ou $16 : 1 \omega 7$ | acide palmitoléique | $C_{18} : 2 \Delta^{9,12}$ ou $18 : 2 \omega 6$         | acide linoléique    |
| $C_{18} : 1 \Delta^9$ ou $18 : 1 \omega 9$ | acide oléique       | $C_{18} : 3 \Delta^{9,12,15}$ ou $16 : 3 \omega 3$      | acide linoléinique  |
|                                            |                     | $C_{20} : 4 \Delta^{5, 8, 11, 14}$ ou $20 : 4 \omega 6$ | acide arachidonique |

Remarque : l'isomérisie E (entgegen) / Z (zusammen) (anciennement cis / trans) pour les doubles liaisons est généralement Z.

##### 1.2.4. Propriétés physiques

- Solubilité : insolubles dans l'eau pour  $n > 8$  mais solubles dans les solvants organiques.
- Point de fusion : liquides si  $n < 10$ , solides si  $n > 10$ , à nombre de carbones égaux, la présence de doubles liaisons diminue la température de fusion.





## 2. Méthodes d'étude

### 2.1. Détermination des indices

**Indice d'acide** ou  $I_A$  : masse d'hydroxyde de potassium ( $M_{\text{KOH}} = 56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), exprimée en mg, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre (acides gras libres) contenus dans 1 g de lipide.

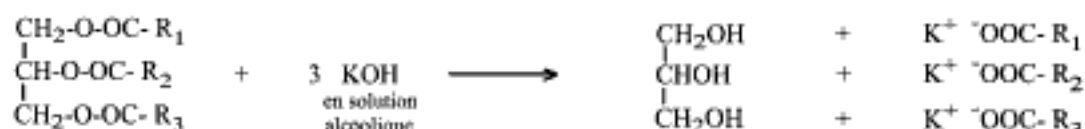
**Indice d'ester** ou  $I_E$  : masse d'hydroxyde de potassium, exprimée en mg, nécessaire pour saponifier les esters contenus dans 1 g de lipide.

**Indice de saponification** ou  $I_S$  : masse d'hydroxyde de potassium, exprimée en mg, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre et pour saponifier les esters contenus dans 1 g de lipide.

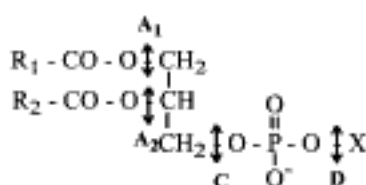
$$I_S = I_A + I_E$$

**Indice d'iode** ou  $I_I$  : masse de diiode ( $M_{\text{I}_2} = 254 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) pouvant se fixer par addition sur les doubles liaisons de 100 g de lipide.

### 2.2. Saponification



### 2.3. Analyse enzymatique d'un glycérophosphoaminolipide



**Phospholipase A<sub>1</sub>** : libère l'acide gras en 1 des glycérophosphoaminolipides.

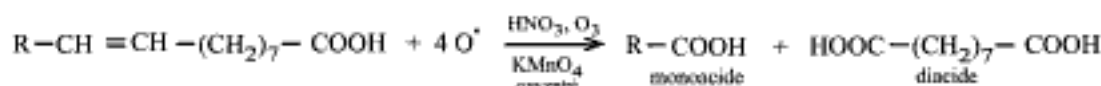
**Phospholipase A<sub>2</sub>** : libère l'acide gras en 2 des glycérophosphoaminolipides.

**Phospholipase C** : scinde le glycérophosphoaminolipide en un diacyl glycérol et un ester phosphorique d'un aminoalcool.

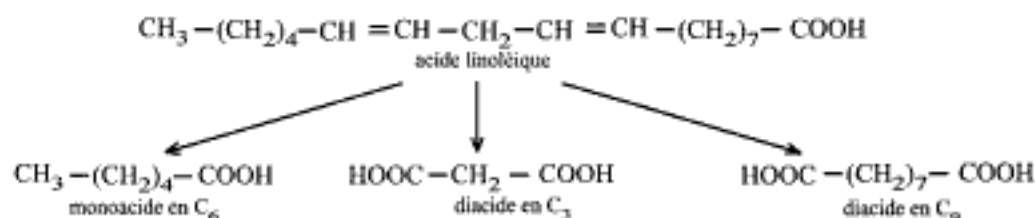
**Phospholipase D** : scinde le glycérophosphoaminolipide en un glycérophospholipide et un aminoalcool.

Remarque : la phospholipase B libère l'acide gras en 1 des lysolécithines (les lysolécithines sont le produit de l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> sur un glycérophosphoaminolipide).

### 2.4. Oxydation des doubles liaisons des acides gras insaturés par les oxydants forts



En présence d'un acide gras à n doubles liaisons, il y a formation de n diacides et d'un monoacide.



### 2.5. Séparation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

### 2.6. Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince (CCM)

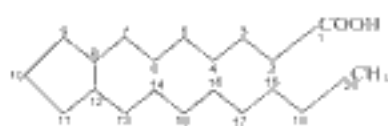
### 2.7. Electrophorèse des lipoprotéines sériques

### 2.8. Ultracentrifugation

### 3. Autres composés apparentés aux lipides

#### 3.1. Prostaglandines et leukotriènes

Substances dérivant d'un acide gras insaturé en C<sub>20</sub> (acide arachidonique):



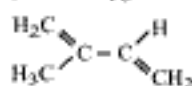
Exemple : acide prostanoïque

- Rôle physiologique de ces substances au niveau :
  - des organes de reproduction ;
  - des muscles lisses de certains tissus ;
  - de l'appareil cardiovasculaire ;
  - du tissu adipeux.
- Intérêt médical : déclenchement de l'accouchement.

#### 3.2. Dérivés isopréniques : stérols, carotènes, caroténoïdes, vitamine A et composés quinoniques

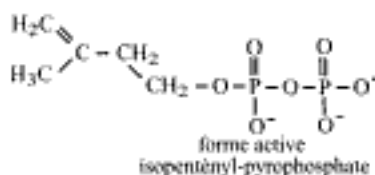
##### 3.2.1. Origine formelle des composés isopréniques

Les composés isopréniques dérivent formellement de l'isoprène et du produit de condensation de 2 isoprènes, les terpènes (C<sub>10</sub>):



isoprène

soit



forme active  
isopentényl-pyrophosphate

##### 3.2.2. Stérols

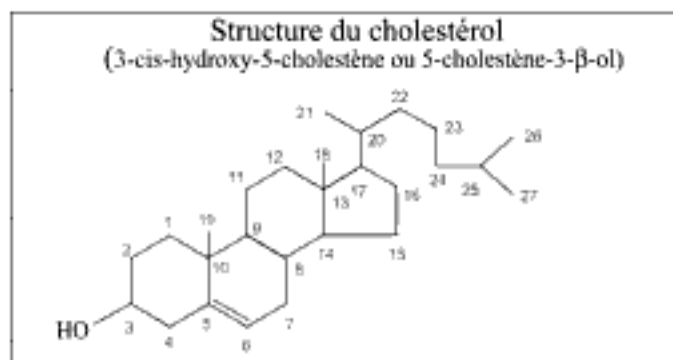
##### Cholestérol (Cs)

Propriétés

- solide cristallisé brillant ;
- insoluble dans l'eau et lévogyre.

Rôles

- précurseur des hormones stéroïdes ;
- antihémolytique.

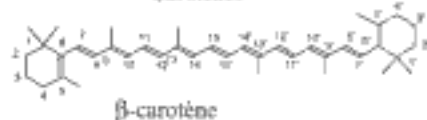


##### Autres stérols

Exemple : stérols végétaux : ergostérol, stigmastérol.

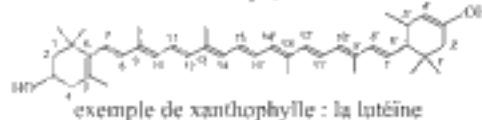
##### 3.2.3. Les caroténoïdes

###### Carotènes



β-carotène

###### Xanthophylles



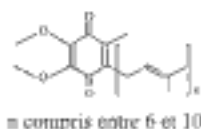
exemple de xanthophylle : la lutéine

##### 3.2.4. La vitamine A<sub>1</sub>



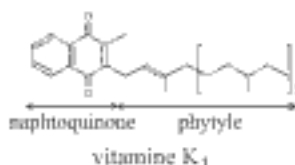
##### 3.2.5. Les composés quinoniques

###### Ubiquinones



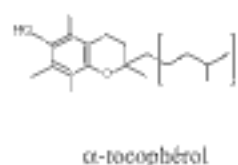
n compris entre 6 et 10

###### Vitamines K



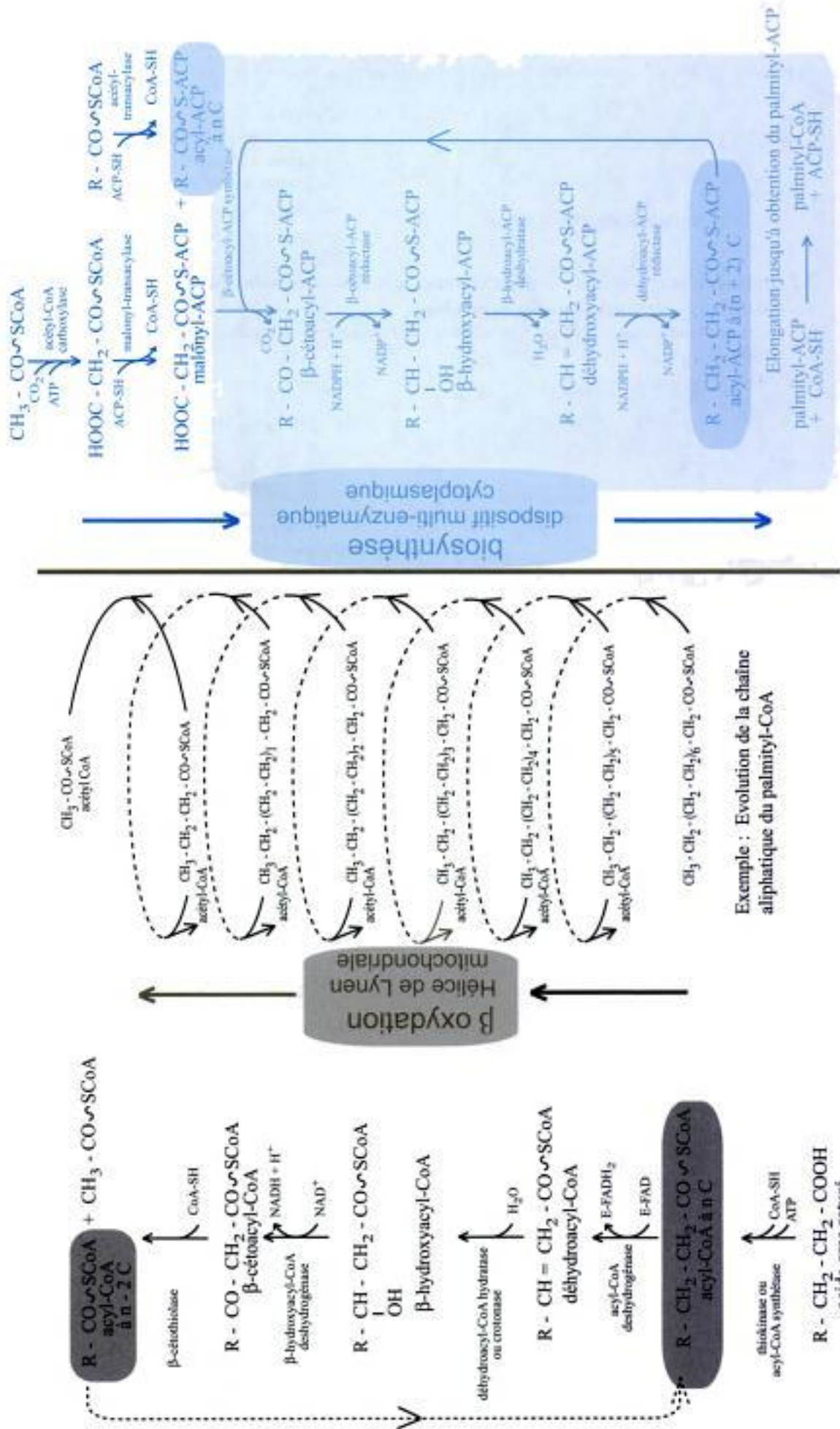
naphthoquinone phytyle  
vitamine K<sub>1</sub>

###### Vitamines E



α-tocophérol

## 4. Dégradation et biosynthèse des acides gras



## Énoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

### Exercice 1      Structure des acides gras

Soient les acides gras dont la formule brute est la suivante :

- $C_{18}H_{36}O_2$       (acide gras saturé) ;
- $C_{18}H_{34}O_2$       (acide gras insaturé,  $\Delta^9$ ) ;
- $C_{18}H_{32}O_2$       (acide gras insaturé,  $\Delta^{9,12}$ ).

1. Nommer et écrire les formules semi développées de ces acides gras.
2. Écrire l'équation de la réaction de neutralisation de l'acide gras saturé par l'hydroxyde de sodium. Donner le nom de la réaction, ainsi que celui du composé obtenu.
3. Pour l'acide gras mono-insaturé, préciser l'isomérisation naturelle (E ou Z) et indiquer les pôles hydrophile et hydrophobe.

### Exercice 2      Indice d'acide et masse molaire moléculaire d'un acide gras

1. Donner la définition de l'indice d'acide d'un corps gras.
2. Établir la relation entre l'indice d'acide et la masse molaire moléculaire d'un acide gras saturé, puis la relation entre l'indice d'acide et le nombre d'atomes de carbone d'un acide gras saturé.
3. Calculer les indices d'acide de l'acide butyrique et de l'acide palmitique. Conclure.

Donnée : Masse molaire moléculaire de l'hydroxyde de potassium,  $M_{KOH} = 56,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### Exercice 3      Indice d'iode et nombre de doubles liaisons d'un acide gras

1. Donner la définition de l'indice d'iode d'un corps gras.
2. Établir une relation entre l'indice d'iode, le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons d'un acide gras.
3. Un acide gras à 18 atomes de carbone présente un indice d'iode égal à 180, en déduire sa structure.

Donnée : Masse molaire moléculaire du diiode,  $M_{I_2} = 254 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### Exercice 4      Étude d'un acide gras

On dispose des résultats expérimentaux suivants :

- il faut verser 14,90 mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à  $0,530 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pour neutraliser 2,00 g de l'acide gras étudié ;
- 1,00 g de cet acide gras fixe 0,98 g de diiode par addition ;
- l'oxydation permanganique de cet acide gras conduit à un mélange de deux acides carboxyliques : un monoacide en  $C_7$  et un diacide en  $C_9$ .

Déduire de ces données la structure de l'acide gras étudié, donner son nom et écrire sa formule semi développée.

Donnée : Masse molaire moléculaire de l'hydroxyde de potassium,  $M_{KOH} = 56,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### Exercice 5      Structure et classification des lipides

- On considère les lipides suivants :
- le trioléylglycérol ;
  - le 2-stéaryl-dipalmitylglycérol ;
  - le 1-palmityl-2-linoléyl-3-laurylglycérol ;
  - le galactosyl-dilinolénylglycérol ;
  - la phosphatidyléthanolamine.

1. A quelle classe de lipides appartiennent ces composés ?
2. Écrire leur formule semi-développée.

**Exercice 6** Indice d'ester et masse molaire moléculaire d'un triacylglycérol

1. Etablir la relation entre l'indice d'ester et la masse molaire moléculaire d'un triacylglycérol.
2. Application : la saponification de 3,00 g d'un triacylglycérol homogène pur nécessite 10,10 mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à  $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ .
  - 2.1. Calculer l'indice d'ester du triacylglycérol.
  - 2.2. Préciser l'identité du triacylglycérol, sachant que l'acide gras constitutif du triacylglycérol est à chaîne linéaire saturée.

Donnée : Masse molaire moléculaire de l'hydroxyde de potassium,  $M_{\text{KOH}} = 56,1 \text{ g.mol}^{-1}$ .

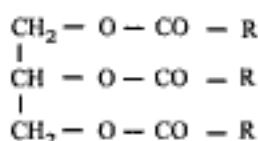
**Exercice 7** Etude d'un triacylglycérol

L'indice de saponification d'un triacylglycérol est égal à 196 et son indice d'iode à 59. L'analyse chromatographique des acides gras constitutifs du triacylglycérol révèle qu'il s'agit d'acide palmitique et d'acide oléique. Déterminer la masse molaire moléculaire de ce triglycéride et sa structure.

Données : - Masse molaire moléculaire de l'hydroxyde de potassium,  $M_{\text{KOH}} = 56,1 \text{ g.mol}^{-1}$  ;  
 - Masse molaire moléculaire du diiode,  $M_{\text{I}_2} = 254 \text{ g.mol}^{-1}$ .

**Exercice 8** Etude d'un mélange d'acide gras et de son triacylglycérol

On se propose, grâce à la détermination de différents indices, d'analyser un corps gras constitué d'un acide gras : R-COOH et de son triacylglycérol homogène :



- Détermination de l'indice d'acide. Dans une fiole d'Erlenmeyer, on introduit 0,400 g de corps gras. On ajoute 20,00 mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium et on dose l'excès d'hydroxyde de potassium par une solution d'acide chlorhydrique à  $0,191 \text{ mol.L}^{-1}$ . La chute de burette obtenue est de 14,80 mL. Un témoin réalisé parallèlement, sans corps gras, donne une chute de burette de 17,80 mL.
- Détermination de l'indice de saponification. Dans un ballon à saponifier, on introduit 0,400 g de corps gras. On ajoute 20,00 mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium et on place ce ballon 1 heure dans un bain-marie à l'ébullition. On dose l'excès d'hydroxyde de potassium par une solution d'acide chlorhydrique à  $0,191 \text{ mol.L}^{-1}$ . La chute de burette obtenue est de 10,60 mL. Un témoin réalisé parallèlement, sans corps gras, donne une chute de burette de 17,80 mL.
- Détermination de l'indice d'iode. Dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri de 250 mL, on introduit 0,204 g de corps gras. On ajoute 20,00 mL de réactif de Wijs. Après 30 min de réaction à l'obscurité, l'excès de réactif de Wijs est dosé par une solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) à  $0,162 \text{ mol.L}^{-1}$ . La chute de burette obtenue est de 15,40 mL. Un témoin réalisé parallèlement, sans corps gras, donne une chute de burette de 24,075 mL.

1. Calculer les indices d'acide, de saponification, d'ester et d'iode du corps gras.
2. Calculer les proportions d'acide gras et de triacylglycérol dans le mélange.
3. Calculer les masses molaires moléculaires de l'acide gras et de son triacylglycérol.
4. Evaluer l'insaturation de l'acide gras et donner une formule semi-développée probable de ce dernier.

Données : - Masse molaire moléculaire de l'hydroxyde de potassium,  $M_{\text{KOH}} = 56,1 \text{ g.mol}^{-1}$  ;  
 - Masse molaire moléculaire du diiode,  $M_{\text{I}_2} = 254 \text{ g.mol}^{-1}$ .

**Exercice 9** Identification de la structure d'un lipide

Un lipide, isolé à partir de cellules nerveuses, soumis à l'action de la phospholipase C permet d'obtenir la phosphorylcholine et un composé A (le carbone 1 du composé A était engagé dans une liaison ester avec l'acide phosphorique).

L'analyse du composé A montre que ce dernier :

- est composé à : 76,7 % de carbone, 12,3 % d'hydrogène, 8,52 % d'oxygène et 2,49 % d'azote ;
- a une masse molaire moléculaire de  $563 \text{ g.mol}^{-1}$ .

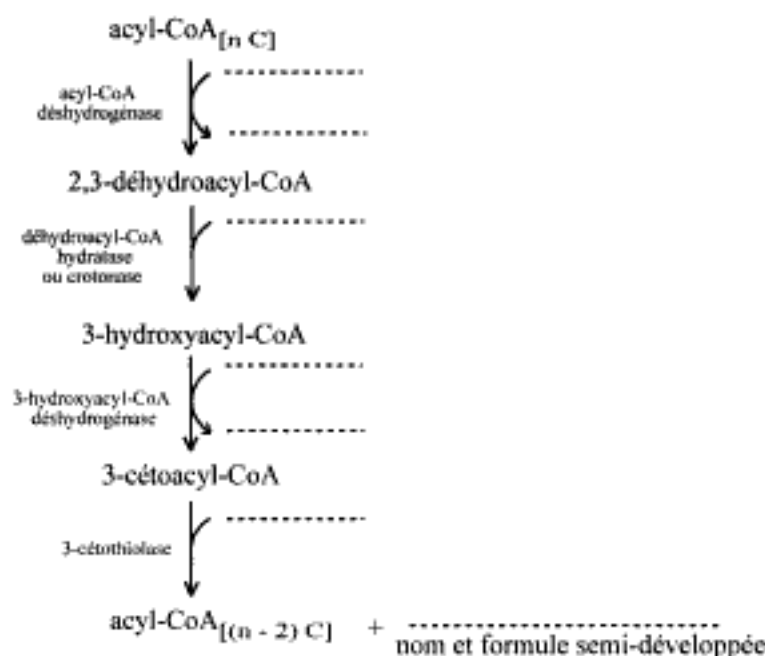
L'hydrolyse acide du composé A conduit à l'acide oléique et à un aminoalcool dans le rapport 1/1. Le groupement amine qui était engagé dans la liaison amide avec l'acide gras se situe sur le carbone 2, les carbones 1 et 3 portent chacun un hydroxyle. Entre le carbone 4 et le carbone 5 il y a une double liaison.

1. Etablir la formule semi-développée et nommer le composé A.
2. Etablir la formule semi-développée et nommer le lipide isolé à identifier.

**Exercice 10** Catabolisme de l'acide stéarique

Le catabolisme aérobie de l'acide stéarique emprunte les voies de la  $\beta$ -oxydation, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.

- Le catabolisme de l'acide stéarique débute par une réaction d'activation qui conduit à la formation de stéaryl-CoA. Ecrire cette réaction.
- Le stéaryl-CoA formé est ensuite oxydé par  $\beta$ -oxydation ; cette voie est souvent représentée par une hélice (hélice de Lypn) dont chaque tour de spire est constitué de 4 réactions indiquées dans le document ci-dessous.
  - Donner la localisation de la  $\beta$ -oxydation.
  - Compléter le document ci-dessous.
  - Établir le bilan moléculaire d'un tour de spire.
  - Calculer le nombre de tours de spire nécessaires pour dégrader le stéaryl-CoA en acétyl-CoA.
- Établir le bilan énergétique de la dégradation aérobie d'une mole d'acide stéarique jusqu'au stade dioxyde de carbone.



- Données:
- Bilan moléculaire du cycle de Krebs :  

$$\text{acétyl-CoA} + \text{FAD} + 3 \text{NAD}^+ + \text{GDP} + \text{Pi} + 2 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{CO}_2 + \text{FADH}_2 + 3 \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CoA-SH} + \text{GTP}$$
  - La réoxydation d'une mole de  $\text{FADH}_2$  dans la chaîne respiratoire produit 2 moles d'ATP.
  - La réoxydation d'une mole de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  dans la chaîne respiratoire produit 3 moles d'ATP.

**Exercice 11** Catabolisme du triaurylglycérol

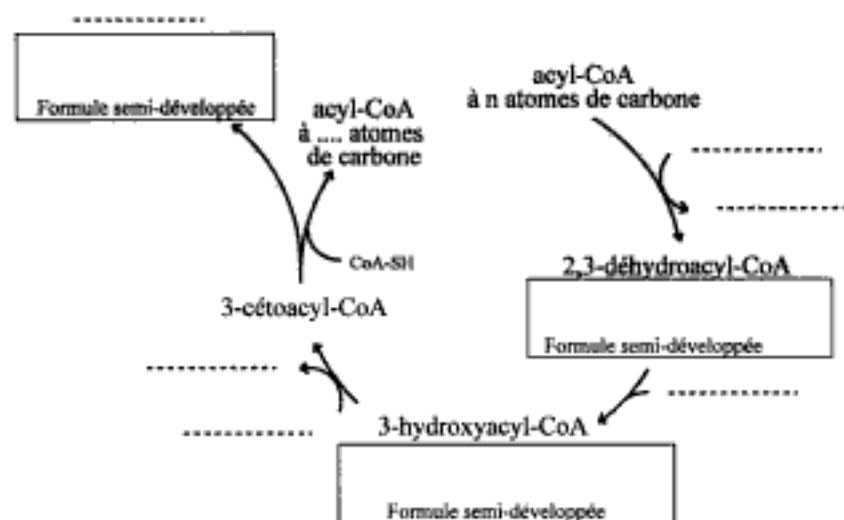
Le triaurylglycérol est un triacylglycérol homogène saturé comportant au total 39 atomes de carbone. L'hydrolyse enzymatique (lipase) du triaurylglycérol libère une molécule de glycérol et trois molécules d'acide laurique. Le catabolisme aérobie de l'acide laurique emprunte les voies de la  $\beta$ -oxydation, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.

- Ecrire l'équation d'hydrolyse enzymatique du triaurylglycérol (formules semi développées exigées).
- L'activation de l'acide laurique conduit à la formation de lauryl-CoA. Le lauryl-CoA formé est ensuite oxydé dans la  $\beta$ -oxydation (voir, hélice de Lypn, document page suivante).
  - Ecrire l'équation d'activation de l'acide laurique.
  - Compléter le document figurant page suivante.
  - Calculer le nombre de tours d'hélice de Lypn nécessaires pour dégrader le lauryl-CoA en acétyl-CoA.
  - Établir le bilan moléculaire puis énergétique de la dégradation aérobie d'une mole d'acide laurique jusqu'au stade dioxyde de carbone
- Établir le bilan énergétique de la dégradation aérobie d'une mole de triaurylglycérol jusqu'au stade dioxyde de carbone.

- Données:
- Bilan moléculaire du cycle de Krebs :



- Le catabolisme aérobie d'une mole de glycérol produit 22 moles d'ATP.
- La réoxydation d'une mole de  $\text{FADH}_2$  dans la chaîne respiratoire produit 2 moles d'ATP.
- La réoxydation d'une mole de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  dans la chaîne respiratoire produit 3 moles d'ATP.



**Exercice 12** Biosynthèse de l'acide palmitique par la voie extramitochondriale

1. Etablir le bilan du passage d'un acide gras à n atomes de carbone à un acide gras à (n + 2) atomes de carbone par la voie de biosynthèse extramitochondriale.
2. Ecrire l'équation de bilan de la synthèse de l'acide palmitique par la voie extramitochondriale à partir de l'acétyl-CoA.



## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Structure des acides gras

1. Nom et formules semi-développées des acides gras

- Acide stéarique :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{COOH}$
- Acide oléique :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$
- Acide linoléique :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

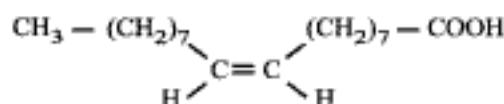
2. Equation de la réaction de neutralisation de l'acide gras saturé



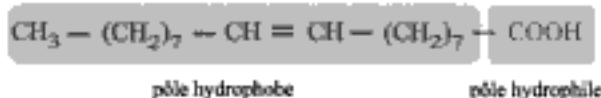
Réaction de saponification où le composé obtenu est le stéarate de sodium, un savon.

3. Isomérisation naturelle et pôles hydrophile et hydrophobe de la molécule

- L'isomérisation naturelle des acides gras est Z (anciennement cis)



- Pôles hydrophile et hydrophobe de la molécule



### Exercice 2 Indice d'acide et masse molaire moléculaire d'un acide gras

1. Définition de l'indice d'acide ( $I_A$ ) d'un corps gras

Masse d'hydroxyde de potassium, exprimée en mg, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre (acides gras libres) contenue dans 1 g de corps gras ( $I_A$  est sans unité).

2. Relation entre l'indice d'acide et la masse molaire moléculaire d'un acide gras saturé et relation entre l'indice d'acide et le nombre d'atomes de carbone d'un acide gras saturé

- Relation entre l'indice d'acide ( $I_A$ ) et la masse molaire moléculaire d'un acide gras saturé ( $M_{AG}$ )



La définition de l'indice d'acide permet d'écrire :  $I_A = \frac{m_{\text{KOH}} \text{ (en mg)}}{m_{\text{AG}} \text{ (en g)}} = \frac{n_{\text{KOH}} \cdot M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{n_{\text{AG}} \cdot M_{\text{AG}}}$

L'équation de la réaction montre que la saponification d'une mole d'acide gras nécessite une mole d'hydroxyde de potassium. Ainsi,

$$\frac{n_{\text{KOH}}}{n_{\text{AG}}} = \frac{1}{1} = 1 \quad \text{D'où} \quad \boxed{I_A = \frac{M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{M_{\text{AG}}}} \quad \text{ou encore} \quad M_{\text{AG}} = \frac{M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{I_A}$$

- Relation entre l'indice d'acide ( $I_A$ ) et le nombre d'atomes de carbone ( $n$ ) d'un acide gras saturé

La formule brute d'un acide gras saturé est  $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$ . La masse molaire moléculaire de l'acide gras peut s'écrire :

$$M_{\text{AG}} = 12 \cdot n + 1 \cdot 2 \cdot n + 16 \cdot 2 \quad \text{soit} \quad M_{\text{AG}} = 14 \cdot n + 32$$

$$\text{et donc} \quad \boxed{I_A = \frac{M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{14 \cdot n + 32}} \quad \text{ou encore} \quad n = \frac{M_{\text{KOH}} \cdot 10^3 - 32 \cdot I_A}{14 \cdot I_A}$$

3. Calcul des indices d'acide de l'acide butyrique et de l'acide palmitique

Pour l'acide butyrique ( $n = 4$ ),  $I_A = 638$  et pour l'acide palmitique ( $n = 16$ ),  $I_A = 219$ .

L'indice d'acide varie en sens inverse du nombre d'atomes de carbone de l'acide gras.

**Exercice 3** Indice d'iode et nombre de doubles liaisons d'un acide gras

1. Définition de l'indice d'iode d'un corps gras

Masse de diiode, exprimée en g, pouvant se fixer par addition sur les doubles liaisons de 100 g de corps gras ( $I_i$  sans unité).

2. Relation entre l'indice d'iode ( $I_i$ ), le nombre d'atomes de carbone ( $n$ ) et le nombre de doubles liaisons ( $p$ ) d'un acide gras insaturé.



La définition de l'indice d'iode permet d'écrire :  $I_i = \frac{m_{I_2} \text{ (en g)} \cdot 100}{m_{AG} \text{ (en g)}} = \frac{n_{I_2} \cdot M_{I_2} \cdot 100}{n_{AG} \cdot M_{AG}}$

L'équation de la réaction montre que l'addition de diiode sur « p » doubles liaisons de l'acide gras nécessite « p » moles de diiode.

$$\text{Ainsi, } \frac{n_{I_2}}{n_{AG}} = \frac{p}{1} = p \quad \text{D'où } I_i = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{M_{AG}}$$

La formule brute d'un acide gras insaturé est  $C_nH_{2n-2p}O_2$ . La masse molaire moléculaire de l'acide gras insaturé peut s'écrire :

$$M_{AG} = 12 \cdot n + 1 \cdot (2 \cdot n - 2 \cdot p) + 16 \cdot 2 \quad \text{soit} \quad M_{AG} = 14 \cdot n - 2 \cdot p + 32$$

$$\text{Et donc } I_i = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{14 \cdot n - 2 \cdot p + 32}$$

$$\text{ou encore } p = \frac{I_i \cdot (14 \cdot n + 32)}{M_{I_2} \cdot 100 + 2 \cdot I_i}$$

3. Acide gras à 18 atomes de carbone et  $I_i = 180$

L'application numérique donne  $p = 1,98$ , soit 2 doubles liaisons pour l'acide gras. L'acide gras pourrait être l'acide linoléique.

Remarque :

En première approximation, il est possible de simplifier la formule littérale permettant le calcul du nombre de doubles liaisons.

Dans la formule littérale :  $I_i = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{14 \cdot n - 2 \cdot p + 32}$ , il est possible de négliger le terme « 2.p » devant le terme « 14.n ».

$$\text{d'où } I_i = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{14 \cdot n + 32} \quad \text{et} \quad p = \frac{I_i \cdot (14 \cdot n + 32)}{M_{I_2} \cdot 100}$$

L'application numérique de la question 3 donne pour résultat :  $p = 2,01$ . Ce qui est très peu différent de 1,98 ou de 2.

**Exercice 4** Etude d'un acide gras

Les résultats expérimentaux permettent de calculer l'indice d'acide et l'indice d'iode.

$$* I_A = \frac{m_{KOH} \text{ (en mg)}}{m_{AG} \text{ (en g)}} = \frac{C_{KOH} \cdot V_{KOH} \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{m_{AG}} \quad \text{D'où } I_A = \frac{0,530 \cdot 14,90 \cdot 10^{-3} \cdot 56,1 \cdot 10^3}{2,00} = 222$$

La connaissance de l'indice d'acide permet, comme dans l'exercice 2, de calculer la masse molaire moléculaire ( $M_{AG}$ ) et le nombre d'atomes de carbone ( $n$ ) de l'acide gras (en négligeant, en première approximation, le nombre de doubles liaisons ( $p$ ) devant le

$$\text{nombre d'atomes de carbone) : } M_{AG} = \frac{M_{KOH} \cdot 10^3}{I_A} \quad \text{soit } M_{AG} = \frac{56,1 \cdot 10^3}{222} = 253 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} ;$$

$$n = \frac{M_{KOH} \cdot 10^3 - 32 \cdot I_A}{14 \cdot I_A} \quad \text{soit } n = \frac{56,1 \cdot 10^3 - 32 \cdot 222}{14 \cdot 222} = 15,8$$

$$* I_i = \frac{m_{I_2} \text{ (en g)} \cdot 100}{m_{AG} \text{ (en g)}} \quad \text{D'où } I_i = \frac{0,98 \cdot 100}{1,00} = 98$$

La connaissance de l'indice d'iode permet, comme dans l'exercice 3, de calculer le nombre de doubles liaisons ( $p$ ) de l'acide gras :

$$p = \frac{I_i \cdot (14 \cdot n + 32)}{M_{I_2} \cdot 100 + 2 \cdot I_i} \quad \text{soit} \quad p = \frac{98 \cdot (14 \cdot 16 + 32)}{254 \cdot 100 + 2 \cdot 98} = 0,98$$

L'acide gras comprend une double liaison.

\* L'oxydation permanganique nous donne un monoacide en  $C_7$  et un diacide en  $C_9$ . Il y a donc une double liaison en  $\Delta^9$ . L'acide gras étudié est donc l'acide palmitoléique ( $C_{16} : 1 \Delta^9$ ).

Remarque :

La formule brute d'un acide gras mono saturé est  $C_nH_{2n+2}O_2$ . La masse molaire moléculaire de l'acide gras peut s'écrire :

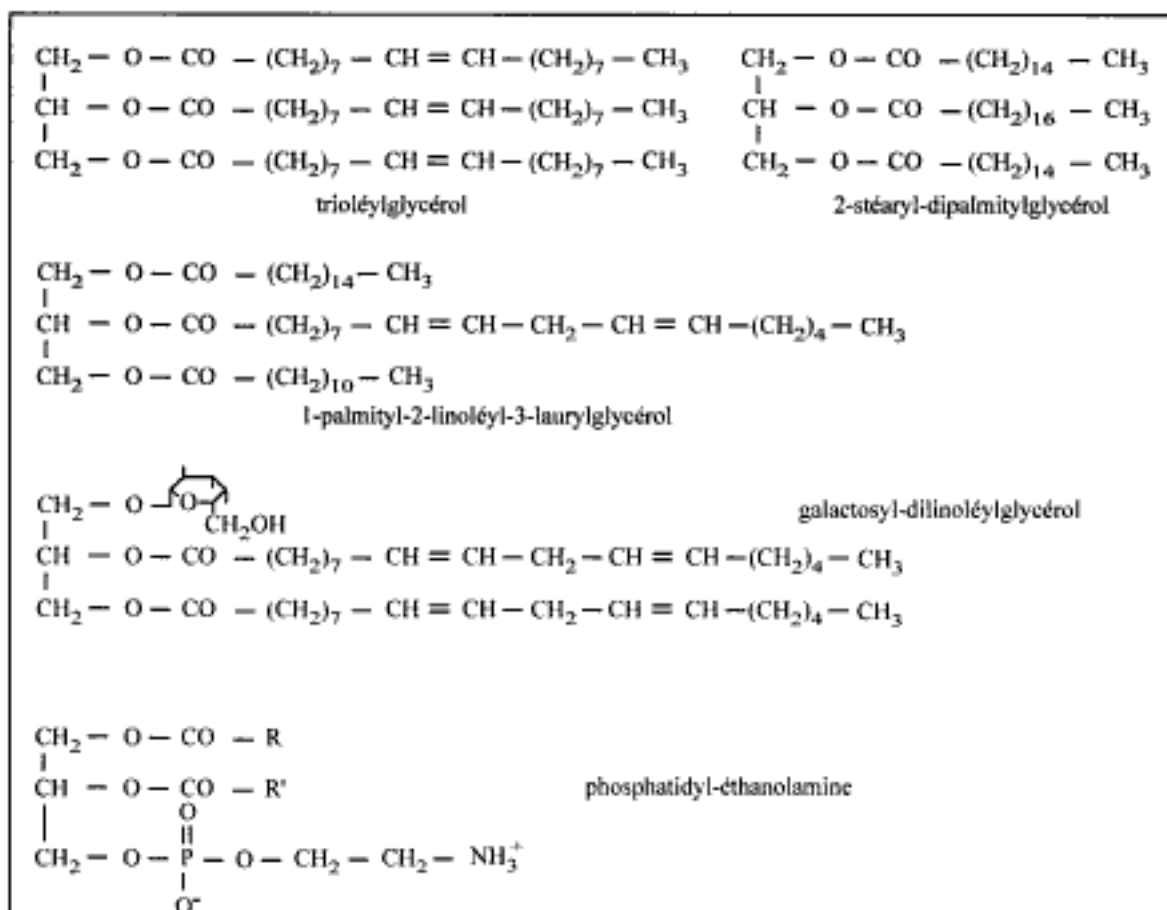
$$M_{AG} = 12 \cdot n + 1 \cdot (2 \cdot n + 2) + 16 \cdot 2 \quad \text{soit } M_{AG} = 14 \cdot n + 30$$

Donc  $n = (253 - 30) / 14 = 15,9$ . Ce qui est très peu différent de 15,8 ou de 16. L'approximation faite lors du calcul initial du nombre d'atomes de carbone était correcte.

### Exercice 5 Structure et classification des lipides

1. Ils appartiennent tous à la classe des glycérolipides (glycérides et/ou glycérophospholipides)

2. Formules



### Exercice 6 Indice d'ester et masse molaire moléculaire d'un triacylglycérol

1. Relation entre l'indice d'ester ( $I_E$ ) et la masse molaire moléculaire d'un triacylglycérol ( $M_{TG}$ )



La définition de l'indice d'ester permet d'écrire :  $I_E = \frac{m_{\text{KOH}} \text{ (en mg)}}{m_{\text{TG}} \text{ (en g)}} = \frac{n_{\text{KOH}} \cdot M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{n_{\text{TG}} \cdot M_{\text{TG}}}$

L'équation de la réaction montre que la saponification d'une mole de triacylglycérol nécessite trois moles d'hydroxyde de potassium.

Ainsi,  $\frac{n_{\text{KOH}}}{n_{\text{TG}}} = \frac{3}{1} = 3$  D'où  $I_E = \frac{3 \cdot M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{M_{\text{TG}}}$  ou encore  $M_{\text{TG}} = \frac{3 \cdot M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{I_E}$

2. Application

2.1. Indice d'ester du triacylglycérol

$$I_E = \frac{m_{\text{KOH}} \text{ (en mg)}}{m_{\text{AG}} \text{ (en g)}} = \frac{C_{\text{KOH}} \cdot V_{\text{KOH}} \cdot M_{\text{KOH}} \cdot 10^3}{m_{\text{AG}}} \quad \text{D'où } I_E = \frac{1,00 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \cdot 56,1 \cdot 10^3}{3,00} = 189$$

## 2.2. Identité du triacylglycérol

- Les valeurs expérimentales permettent de calculer la masse molaire moléculaire du triacylglycérol :

$$M_{TG} = \frac{3 \cdot 56,1 \cdot 10^3}{189} = 890,5 \text{ g.mol}^{-1}$$

- Un triacylglycérol homogène est le produit de l'estérification d'une molécule de glycérol par trois molécules d'acides gras identiques avec élimination de trois molécules d'eau. La masse molaire moléculaire du triacylglycérol peut s'écrire :

$$M_{TG} = M_{Glycérol} + 3 \cdot M_{AG} - 3 \cdot M_{H_2O}$$

d'où  $M_{AG} = (M_{TG} - M_{Glycérol} + 3 \cdot M_{H_2O}) / 3$ , Soit  $M_{AG} = (890,5 - 92 + 3 \cdot 18) / 3 = 284,2 \text{ g.mol}^{-1}$ .

- La formule brute d'un acide gras saturé est  $C_nH_{2n}O_2$ . La masse molaire moléculaire de l'acide gras peut s'écrire :

$$M_{AG} = 12 \cdot n + 1 \cdot 2 \cdot n + 16 \cdot 2 \quad \text{soit} \quad M_{AG} = 14 \cdot n + 32$$

et donc  $n = (284,2 - 32) / 14 = 18$ .

L'acide gras est l'acide stéarique et le triglycéride considéré est le tristéarylglycérol ou tristéarine.

## Exercice 7 Etude d'un triacylglycérol

L'énoncé fait état de l'étude d'un triacylglycérol. Le vase réactionnel est donc exempt d'acides gras libres et l'indice d'acide est nul. De ce fait l'indice d'ester est égal à l'indice de saponification,  $I_E = I_S = 196$ .

La connaissance de l'indice d'ester ( $I_E$ ) permet de calculer la masse molaire moléculaire du triacylglycérol ( $M_{TG}$ ) (voir exercice 6) :

$$M_{TG} = \frac{3 \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{I_E} \quad \text{soit} \quad M_{TG} = \frac{3 \cdot 56,1 \cdot 10^3}{196} = 859 \text{ g.mol}^{-1}$$

La connaissance de l'indice d'iode ( $I_I$ ) et de la masse molaire moléculaire permet de calculer le nombre de doubles liaisons ( $p$ ) du triacylglycérol



La définition de l'indice d'iode permet d'écrire :  $I_I = \frac{m_{I_2} \text{ (en g)} \cdot 100}{m_{TG} \text{ (en g)}} = \frac{n_{I_2} \cdot M_{I_2} \cdot 100}{n_{TG} \cdot M_{TG}}$

L'équation simplifiée de réaction montre que l'addition de diiode sur « p » doubles liaisons du triacylglycérol nécessite « p » moles de diiode.

Ainsi,  $\frac{n_{I_2}}{n_{TG}} = \frac{p}{1} = p$  d'où  $I_I = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{M_{TG}}$  ou encore,  $p = \frac{I_I \cdot M_{TG}}{M_{I_2} \cdot 100}$  soit  $p = \frac{59 \cdot 859}{254 \cdot 100} = 2,0$

Le triacylglycérol comprend deux doubles liaisons.

L'analyse chromatographique des acides gras constitutifs du triacylglycérol révèle qu'il s'agit d'acide palmitique et d'acide oléique. Le triacylglycérol comprend donc deux acides oléiques et un acide palmitique (la position respective des différents acides gras ne peut être déterminée ici).

Le triacylglycérol considéré est donc le dioléyl-palmityl-glycérol.

## Exercice 8 Etude d'un mélange d'acide gras et de son triacylglycérol

1. Calcul des indices d'acide, de saponification, d'ester et d'iode du corps gras (CG).

Les principes du calcul des indices sont développés dans le cadre des travaux pratiques, cependant on peut noter que :

- la définition de l'indice d'acide permet d'écrire :

$$I_A = \frac{m_{KOH} \text{ (en mg)}}{m_{CG} \text{ (en g)}} = \frac{n_{KOH} \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{m_{CG}} = \frac{C_{HCl} \cdot (V_{HCl_{titré}} - V_{HCl_{total}}) \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{m_{CG}}$$

d'où  $I_A = \frac{0,191 \cdot (17,80 \cdot 10^{-3} - 14,80 \cdot 10^{-3}) \cdot 56,1 \cdot 10^3}{0,400} = 80,4$

- La définition de l'indice de saponification permet d'écrire :

$$I_S = \frac{m_{KOH} \text{ (en mg)}}{m_{CG} \text{ (en g)}} = \frac{n_{KOH} \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{m_{CG}} = \frac{C_{HCl} \cdot (V_{HCl_{titré}} - V_{HCl_{total}}) \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{m_{CG}}$$

d'où  $I_S = \frac{0,191 \cdot (17,80 \cdot 10^{-3} - 10,60 \cdot 10^{-3}) \cdot 56,1 \cdot 10^3}{0,400} = 192,9$

- l'indice d'ester se déduit des indices d'acide et de saponification,

$$I_E = I_S - I_A \text{ soit } I_E = 192,9 - 80,4 = 112,5$$

- la définition de l'indice d'iode permet d'écrire :

$$I_1 = \frac{m_{I_2} \text{ (en g)} \cdot 100}{m_{CCl_4} \text{ (en g)}} = \frac{n_{I_2} \cdot M_{I_2} \cdot 100}{m_{CCl_4}} = \frac{C_{Na_2S_2O_3} \cdot (V_{Na_2S_2O_3_{\text{consommé}}} - V_{Na_2S_2O_3_{\text{dans}}}) \cdot M_{I_2} \cdot 100}{2 \cdot m_{CCl_4}}$$

$$\text{D'où } I_1 = \frac{0,162 \cdot (24,075 \cdot 10^{-3} - 15,40 \cdot 10^{-3}) \cdot 254 \cdot 100}{2 \cdot 0,204} = 87,5$$

2. Calcul des proportions d'acide gras et de triacylglycérol dans le mélange.

Soit  $x$  la masse d'acide gras et  $y$  la masse de triacylglycérol contenues dans 1 gramme de corps gras et soit  $M_{AG}$  la masse molaire moléculaire de l'acide gras.

La masse molaire moléculaire du triacylglycérol ( $M_{TG}$ ) est donnée par la formule :

$$M_{TG} = M_{Glycérol} + 3 \cdot M_{AG} - 3 \cdot M_{H_2O} \quad \text{d'où } M_{TG} = 3 \cdot M_{AG} + 38.$$

- Indice d'acide



L'équation de la réaction montre que la saponification d'une mole d'acide gras, soit " $M_{AG}$ " g d'acide gras, nécessite une mole d'hydroxyde de potassium, soit " $M_{KOH} \cdot 10^3$ " mg d'hydroxyde de potassium. De la même manière, la saponification de " $x$ " g d'acide gras nécessite " $I_A$ " mg d'hydroxyde de potassium. On a donc la relation :

$$M_{AG} = \frac{M_{KOH} \cdot 10^3 \cdot x}{I_A}$$

- Indice d'ester



L'équation de la réaction montre que la saponification d'une mole de triacylglycérol, soit " $M_{TG}$ " g triacylglycérol nécessite trois moles d'hydroxyde de sodium, soit " $3 \cdot M_{KOH} \cdot 10^3$ " mg d'hydroxyde de potassium. De la même manière, la saponification de " $y$ " g

triacylglycérol nécessite " $I_E$ " mg d'hydroxyde de sodium. On a donc la relation :  $M_{TG} = \frac{3 \cdot M_{KOH} \cdot 10^3 \cdot y}{I_E}$

Or  $M_{TG} = 3 \cdot M_{AG} + 38$  d'où

$$M_{AG} = \frac{3 \cdot M_{KOH} \cdot 10^3 \cdot y - 38 \cdot I_E}{3 \cdot I_E}$$

- On a donc un système de deux équations à deux inconnues

$$(1) \quad \frac{3 \cdot M_{KOH} \cdot 10^3 \cdot x}{I_A} = \frac{3 \cdot M_{KOH} \cdot 10^3 \cdot y - 38 \cdot I_E}{3 \cdot I_E}$$

$$(2) \quad x + y = 1$$

La résolution du système d'équations donne :  $x = 0,406$   
 $y = 0,594$

Ainsi, le corps gras est composé à 40,6 % d'acide gras et à 59,4 % de triacylglycérol.

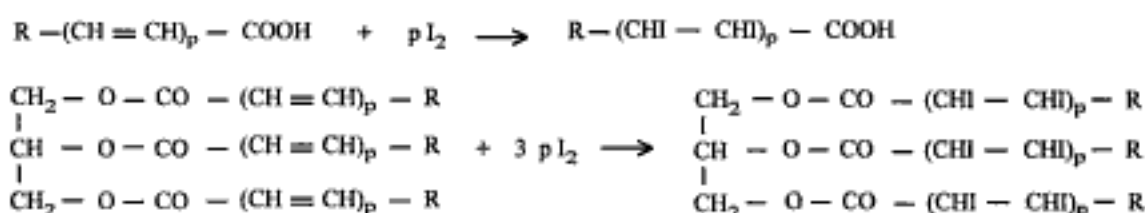
3. Calcul des masses molaires moléculaires de l'acide gras et de son triacylglycérol.

- La masse molaire moléculaire de l'acide gras peut être calculée à partir de la relation établie pour la question 2 :

$$M_{AG} = \frac{M_{KOH} \cdot 10^3 \cdot x}{I_A} \quad \text{soit } M_{AG} = \frac{56,1 \cdot 10^3 \cdot 0,406}{80,4} = 283,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

-  $M_{TG} = 3 \cdot M_{AG} + 38$  soit  $M_{TG} = 3 \cdot 283,3 + 38 = 887,9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

4. Evaluation de l'insaturation de l'acide gras et proposition d'une formule semi développée probable de ce dernier.



- Pour l'acide gras, il est possible d'établir, comme dans l'exercice 3, une relation entre l'indice d'iode et le nombre de doubles liaisons (p) de l'acide gras :  $I_{AG} = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{M_{AG}}$

- Pour le triacylglycérol, la définition de l'indice d'iode permet d'écrire :  $I_{TG} = \frac{m_{I_2} \text{ (en g)} \cdot 100}{m_{TG} \text{ (en g)}} = \frac{n_{I_2} \cdot M_{I_2} \cdot 100}{n_{TG} \cdot M_{TG}}$

L'équation de réaction montre que l'addition de diiode sur « p » doubles liaisons des acides gras constitutifs du triacylglycérol nécessite « 3. p » moles de diiode. Ainsi,  $\frac{n_{I_2}}{n_{TG}} = \frac{3 \cdot p}{1} = 3 \cdot p$  D'où  $I_{TG} = \frac{3 \cdot p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{M_{TG}}$

- L'indice d'iode déterminé expérimentalement est égal à la somme des indices d'iode de l'acide gras et du triacylglycérol corrigés de leur proportion respective :  $I_t = I_{AG} \cdot \frac{40,6}{100} + I_{TG} \cdot \frac{59,4}{100}$

$$\text{Soit } I_t = \frac{p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{M_{AG}} \cdot \frac{40,6}{100} + \frac{3 \cdot p \cdot M_{I_2} \cdot 100}{M_{TG}} \cdot \frac{59,4}{100}$$

$$\text{D'où } p = \frac{I_t}{M_{I_2} \cdot \left( \frac{40,6}{M_{AG}} + \frac{3 \cdot 59,4}{M_{TG}} \right)}$$

$$\text{soit } p = \frac{87,5}{254 \cdot \left( \frac{40,6}{283,3} + \frac{3 \cdot 59,4}{887,9} \right)} = 1$$

L'acide gras présente donc une double liaison.

La formule brute d'un acide gras mono insaturé est  $C_nH_{2n-2}O_2$ . La masse molaire moléculaire de l'acide gras insaturé peut s'écrire :  $M_{AG} = 12 \cdot n + 1 \cdot (2 \cdot n - 2) + 16 \cdot 2 = 14 \cdot n + 30$ . D'où  $n = (M_{AG} - 30) / 14$  soit  $n = (283,3 - 30) / 14 = 18,1$

L'acide gras pourrait être l'acide oléique :  $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$

### Exercice 9 Identification de la structure d'un lipide

1. Formule semi-développée et nom du composé A

- L'analyse du composé A montre que ce dernier est composé de : 76,7 % de carbone, 12,3 % d'hydrogène, 8,52 % d'oxygène et 2,49 % d'azote.

De ce fait, 100 g du composé A contiennent :  $76,7 / 12 = 6,39$  atomes de carbone ;

$12,3 / 1 = 12,3$  atomes d'hydrogène ;

$8,52 / 16 = 0,532$  atomes d'oxygène ;

$2,49 / 14 = 0,178$  atomes d'azote.

Si on ramène ces proportions à 1 atome d'azote, nous aurons :  $6,39 / 0,178 = 35,9$  atomes de carbone ;

$12,3 / 0,178 = 69,1$  atomes d'hydrogène ;

$0,532 / 0,178 = 2,99$  atomes d'oxygène.

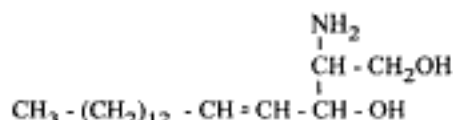
La formule brute minimale de ce composé est  $C_{36}H_{69}O_3N$ , ce qui correspondrait à une masse molaire moléculaire minimale de  $563 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Or, cette valeur est identique à celle déterminée.  $C_{36}H_{69}O_3N$  représente bien la formule brute d'une molécule de composé A.

- L'hydrolyse acide du composé A conduit à l'acide oléique et à un aminoalcool dans le rapport 1/1. Le composé A est donc formé d'une molécule de l'ainoalcool et d'une molécule d'acide oléique, réunis par une liaison amide avec élimination d'une molécule d'eau :



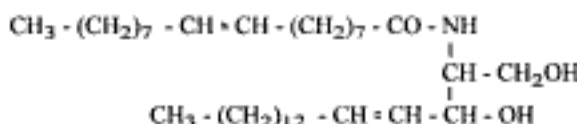
La formule brute du composé A est  $C_{36}H_{69}O_3N$ , celle de l'acide oléique est  $C_{18}H_{34}O_2$ . L'ainoalcool constitutif de ce composé a donc pour formule brute  $C_{18}H_{37}O_2N$ . Cette formule brute correspond à une chaîne linéaire de 18 atomes de carbone qui porte sur les carbones 1 et 3 un hydroxyle, sur le carbone 2 une fonction amine et une double liaison entre les carbones 4 et 5.

L'ainoalcool constitutif du composé A est la sphingosine :



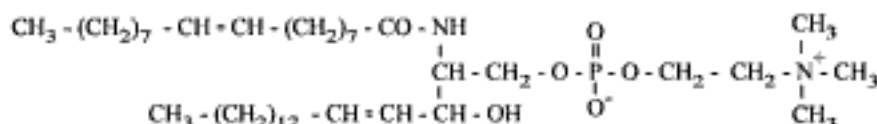
NB : La masse molaire moléculaire du composé A ( $M_A$ ) est donnée par la formule  $M_A = M_{\text{Acide Oléique}} + M_{\text{Aminoalcool}} - M_{\text{H}_2\text{O}}$  d'où  $M_{\text{Aminoalcool}} = M_A - M_{\text{Acide Oléique}} + M_{\text{H}_2\text{O}}$  soit  $M_{\text{Aminoalcool}} = 563 - 282 + 18 = 299 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Cette valeur correspond à la masse molaire moléculaire de la sphingosine.

- Le composé A, obtenu par amidification de la sphingosine par l'acide oléique, est un céramide, structure de base des sphingolipides :



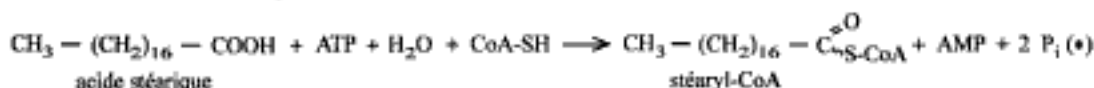
2. Formule semi-développée et nom du lipide isolé à identifier.

Le composé lipidique analysé dans cet exercice est la sphingomyéline, un céramide dont l'hydroxyle du carbone 1 est estérifié par la phosphorylcholine :



### Exercice 10 Catabolisme de l'acide stéarique

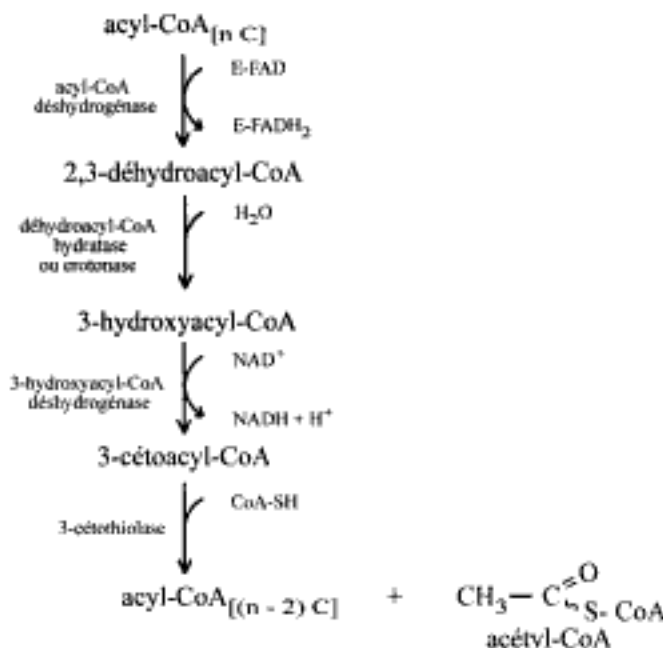
1. Equation d'activation de l'acide stéarique :



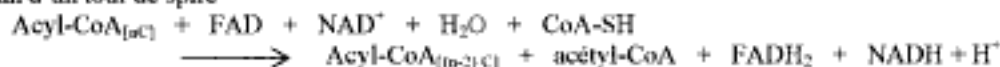
2.  $\beta$ -oxydation

2.1. La  $\beta$ -oxydation se déroule dans la mitochondrie après transfert de l'acyl-CoA à travers la membrane interne (catalysé par l'acyl-carnitine transférase).

2.2. Document :



2.3. Bilan d'un tour de spire



2.4. Nombre de tours de spire : à chaque tour de spire on détache 2 carbones, sauf au dernier où on récupère 2 fois 2 carbones. Le stéaryl-CoA comportant 18 carbones, il faut  $18 / 2 - 1 = 8$  tours de spire.

## 3. Bilan énergétique de la dégradation aérobie d'une mole d'acide stéarique jusqu'au stade dioxyde de carbone.

|                                                | ATP produits            | ATP consommés |
|------------------------------------------------|-------------------------|---------------|
| Activation                                     | /                       | 2 (*)         |
| $\beta$ -oxydation (8 tours de spire) :        |                         |               |
| - Formation de 8 NADH, H <sup>+</sup>          | 24                      | /             |
| - Formation de 8 FADH <sub>2</sub>             | 16                      | /             |
| Cycle de Krebs (9 cycles) :                    |                         |               |
| - Formation de 9 GTP                           | 9                       | /             |
| - Formation de 3 · 9 = 27 NADH, H <sup>+</sup> | 81                      | /             |
| - Formation de 9 FADH <sub>2</sub>             | 18                      | /             |
| <b>Bilan</b>                                   | <b>146 ATP produits</b> |               |

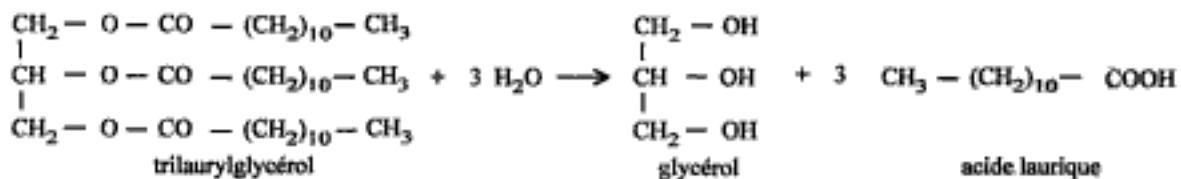
(\*) : L'activation de l'acide gras a consommé 1 ATP mais il y a eu 2 liaisons à haut potentiel d'hydrolyse consommées car celle du pyrophosphate n'est pas récupérée, il s'hydrolyse spontanément en phosphate en présence d'une pyrophosphatase cytoplasmique :  $\text{PPi} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Pi}$

L'activation peut donc être considérée comme consommant 2 molécules d'ATP

**Exercice 11 Catabolisme du trioléoylglycérol**

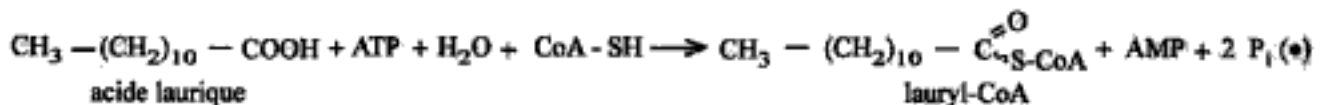
## 1. Hydrolyse enzymatique du trioléoylglycérol.

Diverses lipases, selon les tissus, peuvent hydrolyser les triacylglycérols ; l'hydrolyse est plus ou moins complète avec formation de 2,3-diacylglycérol, 2-acylglycérol et acylglycérol (positions 1 ou 3, identiques du point de vue structural) :

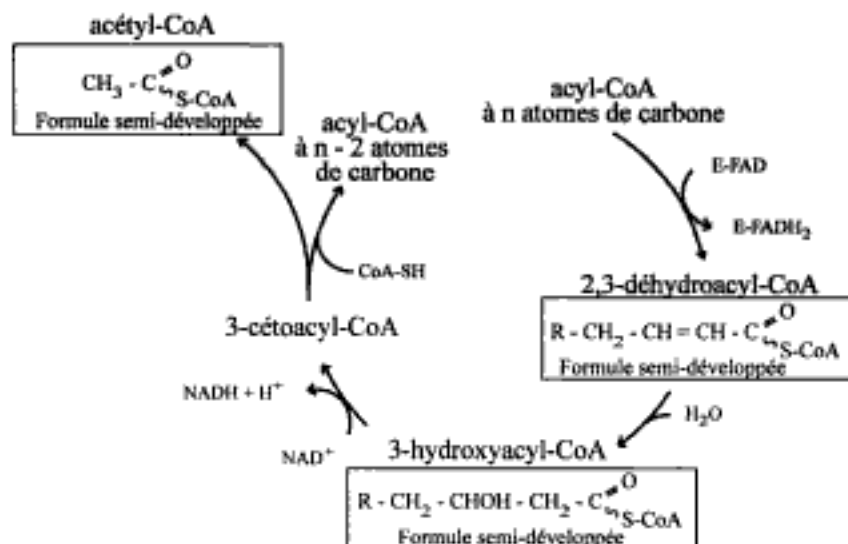


## 2. Catabolisme de l'acide laurique

## 2.1. Equation d'activation de l'acide laurique :



## 2.2. Document :

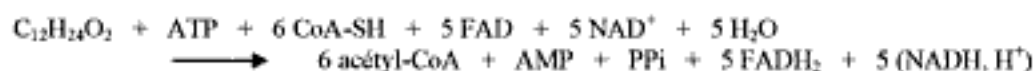


2.3. Nombre de tours d'hélice de Lynen : à chaque tour d'hélice on détache 2 carbones, sauf au dernier où on récupère 2 fois 2 carbones. Le lauryl-CoA comportant 12 carbones il faut donc  $12 / 2 - 1 = 5$  tours d'hélice.



2.4. Bilans moléculaire et énergétique de la dégradation aérobie d'une mole d'acide laurique jusqu'au stade dioxyde de carbone :

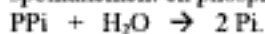
- Bilan moléculaire, il y a 5 tours d'hélice :



- Bilan énergétique :

|                                                | ATP produits           | ATP consommés |
|------------------------------------------------|------------------------|---------------|
| Activation                                     | /                      | 2 (*)         |
| $\beta$ -oxydation (5 tours de spire) :        |                        |               |
| - Formation de 5 NADH, H <sup>+</sup>          | 15                     | /             |
| - Formation de 5 FADH <sub>2</sub>             | 10                     |               |
| Cycle de Krebs (6 cycles) :                    |                        |               |
| - Formation de 6 GTP                           | 6                      | /             |
| - Formation de 3 . 6 = 18 NADH, H <sup>+</sup> | 54                     |               |
| - Formation de 6 FADH <sub>2</sub>             | 12                     |               |
| <b>Bilan</b>                                   | <b>95 ATP produits</b> |               |

(\*) : L'activation de l'acide gras a consommé 1 ATP mais il y a eu 2 liaisons à haut potentiel d'hydrolyse consommées car celle du pyrophosphate n'est pas récupérée, il s'hydrolyse spontanément en phosphate en présence d'une pyrophosphatase cytoplasmique :

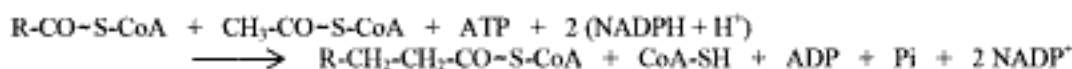


L'activation peut être considérée comme consommant 2 molécules d'ATP

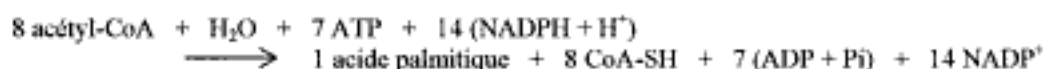
3. Bilan énergétique de la dégradation aérobie d'une mole de trilaurylglycérol jusqu'au stade dioxyde de carbone. L'oxydation complète de 1 mole de glycérol conduit à la formation de 22 ATP et l'oxydation complète de 1 mole d'acide laurique conduit à la formation de 95 ATP. Le total pour le trilaurylglycérol est de 307 ATP

#### Exercice 12 Biosynthèse de l'acide palmitique par la voie extramitochondriale

1. Bilan du passage d'un acide gras à n atomes de carbone à un acide gras à (n + 2) atomes de carbone :



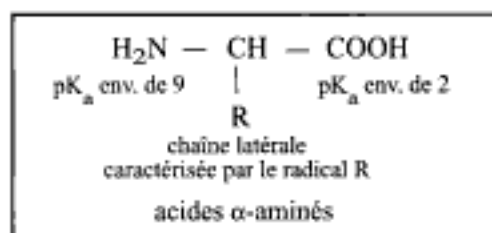
2. Bilan de la synthèse de l'acide palmitique par la voie extramitochondriale à partir de l'acétyl-CoA :



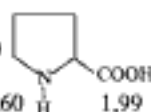
## 4 - Protides

## Acides aminés

## 1. Structure des acides aminés



sauf la proline Pro P

M = 115 g . mol<sup>-1</sup> p*H*<sub>1</sub> = 6,30(En gras, les p*K*<sub>a</sub> de la chaîne latérale R)**R apolaires**

|                                                       |                                                                                    |  |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Glycine</b><br>M = 75 g . mol <sup>-1</sup>        | <b>Gly G</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,97<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,34 9,60 |  |
| <b>Alanine</b><br>M = 89 g . mol <sup>-1</sup>        | <b>Ala A</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 6,02<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,35 9,69 |  |
| <b>Valine</b><br>M = 117 g . mol <sup>-1</sup>        | <b>Val V</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,97<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,32 9,62 |  |
| <b>Méthionine</b><br>M = 149 g . mol <sup>-1</sup>    | <b>Met M</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,75<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,28 9,21 |  |
| <b>Leucine</b><br>M = 131 g . mol <sup>-1</sup>       | <b>Leu L</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,98<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,36 9,60 |  |
| <b>Isoleucine</b><br>M = 131 g . mol <sup>-1</sup>    | <b>Ile I</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 6,02<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,36 9,68 |  |
| <b>Phénylalanine</b><br>M = 165 g . mol <sup>-1</sup> | <b>Phe F</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,48<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 1,83 9,13 |  |
| <b>Tryptophane</b><br>M = 204 g . mol <sup>-1</sup>   | <b>Trp W</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,89<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,38 9,39 |  |

**R polaires non chargées**

|                                                    |                                                                                          |  |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Sérine</b><br>M = 105 g . mol <sup>-1</sup>     | <b>Ser S</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,68<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,21 9,15       |  |
| <b>Thréonine</b><br>M = 119 g . mol <sup>-1</sup>  | <b>Thr T</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 6,53<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,63 10,43      |  |
| <b>Cystéine</b><br>M = 121 g . mol <sup>-1</sup>   | <b>Cys C</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,02<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 1,71 8,33 10,78 |  |
| <b>Tyrosine</b><br>M = 181 g . mol <sup>-1</sup>   | <b>Tyr Y</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,66<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,20 9,11 10,07 |  |
| <b>Asparagine</b><br>M = 132 g . mol <sup>-1</sup> | <b>Asn N</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,41<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,02 8,80       |  |
| <b>Glutamine</b><br>M = 146 g . mol <sup>-1</sup>  | <b>Gln Q</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 5,65<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,17 9,13       |  |

**R polaires chargées**

|                                                          |                                                                                           |  |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Acide aspartique</b><br>M = 133 g . mol <sup>-1</sup> | <b>Asp D</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 2,96<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,09 3,86 9,82   |  |
| <b>Acide glutamique</b><br>M = 147 g . mol <sup>-1</sup> | <b>Glu E</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 3,22<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,19 4,25 9,67   |  |
| <b>Lysine</b><br>M = 146 g . mol <sup>-1</sup>           | <b>Lys K</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 9,74<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,18 8,95 10,53  |  |
| <b>Arginine</b><br>M = 174 g . mol <sup>-1</sup>         | <b>Arg R</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 10,76<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 2,17 9,04 12,48 |  |
| <b>Histidine</b><br>M = 155 g . mol <sup>-1</sup>        | <b>His H</b> p <i>H</i> <sub>1</sub> = 7,59<br>p <i>K</i> <sub>a</sub> : 1,82 6,00 9,17   |  |

## 2. Propriétés des acides aminés

### 2.1. Propriétés physiques

Poudres blanches cristallisées.

Solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques variables selon R.

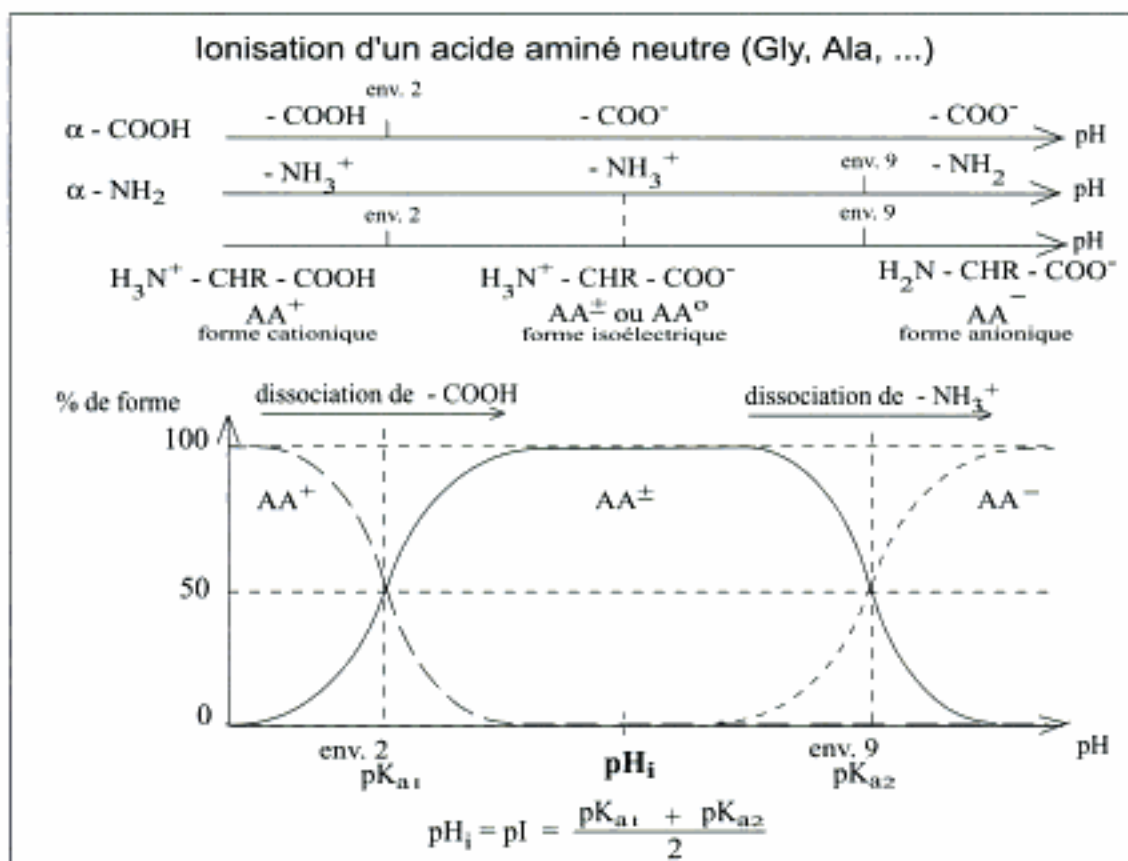
En général, un carbone asymétrique ; les acides aminés sont, pour la plupart, de la série L chez les eucaryotes.

$pH_i$  ou  $pI$  :  $pH$  isoélectrique.  
pH pour lequel  
la charge électrique nette  
est nulle.

### 2.2. Propriétés physico-chimiques

#### 2.2.1. Ionisation

- Acides aminés neutres :  $pH_i$  = environ 6-7, c'est-à-dire à chaîne latérale apolaire.
- Acides aminés basiques :  $pH_i$  = environ 10, c'est-à-dire à chaîne latérale pouvant être chargée positivement.
- Acides aminés acides :  $pH_i$  = environ 4, c'est-à-dire à chaîne latérale pouvant être chargée négativement.



#### 2.2.2. Propriétés spectrales

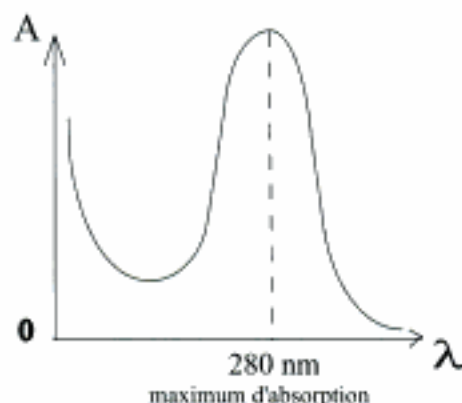
##### • Absorption moléculaire (Trp, Tyr et Phe) :

- Les acides aminés aromatiques ont un maximum d'absorption vers 280 nm.
- Utilisation qualitative et quantitative
  - \* utilisation qualitative : identification de la présence d'acides aminés aromatiques à partir d'un pic d'absorption ayant son maximum à 280 nm ;
  - \* utilisation quantitative : dosage d'acides aminés aromatiques à partir d'une simple mesure d'absorbance à 280 nm (voir "Méthodes optiques").

##### • Emission moléculaire :

- fluorescence : émission de lumière à une longueur d'onde  $\lambda_{em}$  après excitation à une longueur d'onde  $\lambda_{exc}$  (avec  $\lambda_{em} > \lambda_{exc}$  - voir "Méthodes optiques") ; valable pour les acides aminés aromatiques (Trp, par exemple).

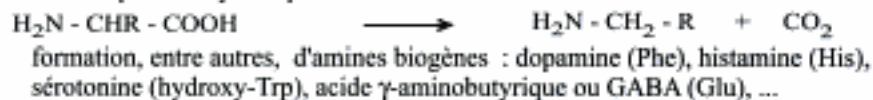
Schéma type du spectre d'absorption d'un acide aminé aromatique



## 2.3. Propriétés chimiques

### 2.3.1. Propriétés du -COOH

- Décarboxylation chimique et enzymatique :



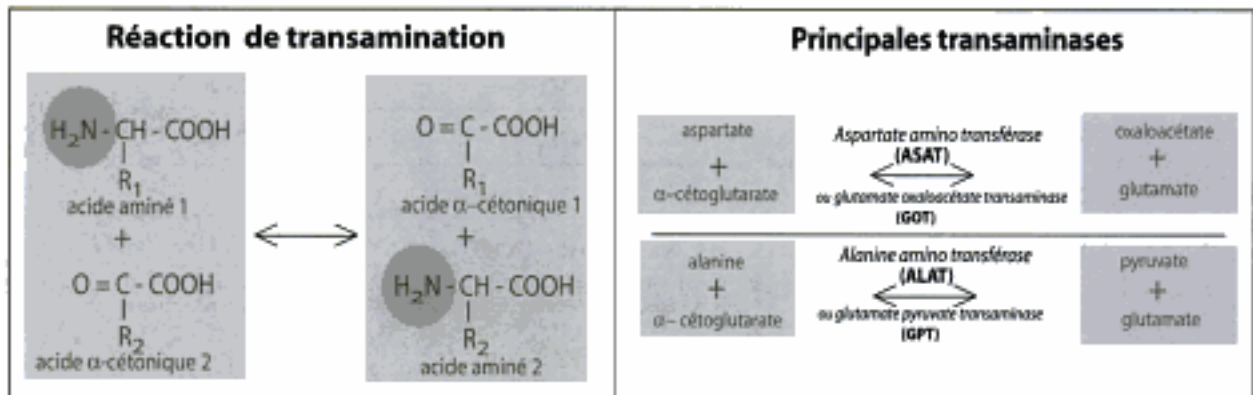
- Amidification : formation de liaison peptidique (écriture formelle) :



- Estérification : protection de -COOH lors de la synthèse peptidique in vitro

### 2.3.2. Propriétés du -NH<sub>2</sub>

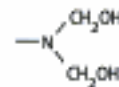
- Désamination enzymatique : désamination oxydative et transamination



- Désamination chimique : action de HNO<sub>2</sub> et dégagement de diazote (dosage volumétrique possible)

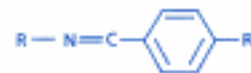
- Addition de carbonyles

- \* Aldéhydes aliphatiques : avec le formol, formation d'un dérivé diméthylol (utilisation dans la formol-titration de Soerensen)



- \* Aldéhydes aromatiques

- imines (bases de Schiff - action du phosphate de pyridoxal ou PLP) ;
- aldéhyde orthophtalique (méthode de dosage fluorimétrique de Roth).



- N-dérivés : formation de dérivés "signal" identifiables et quantifiables (spectrophotométrie ou fluorescence)

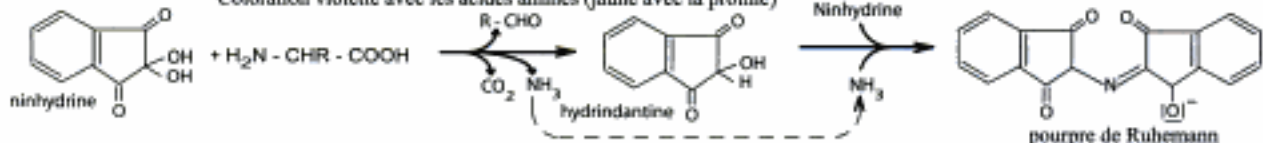
- \* arylation : action du **fluorodinitrobenzène (FDNB - réactif de Sanger)** : DNP-aas jaunes (spectrophotométrie) ;
- \* acylation : action du **chlorure de dansyle** : DNS-aas (fluorescence) ;
- \* carbamylation : action du **phénylthiocyanate (PTC - réactif d'Edman)** : dérivé phénylthiocarbamylé puis, par cyclisation, phénylthiohydantoïne-aas (PTH-aas) (séparables par HPLC - dosables par spectrophotométrie) ; utilisé pour le séquençage des chaînes peptidiques.

Voir détail des réactions  
pages suivantes

### 2.3.3. Propriétés du -COOH et du -NH<sub>2</sub>

- Réaction avec la ninhydrine : décarboxylation et désamination

Coloration violette avec les acides aminés (jaune avec la proline)



- Formation de chélates

### 2.3.4. Propriétés des chaînes latérales

- Réactions spécifiques aux divers groupements chimiques des chaînes latérales : guanidine (réaction de Sakaguchi), phénol (réaction de Folin-Ciocalteu), thiol, ...
- Réactions de protection des chaînes latérales lors de la synthèse peptidique in vitro.

### 3. Méthodes d'étude des acides aminés

#### 3.1. Séparation (Voir aussi "Méthodes chromatographiques")

Les principales méthodes actuellement utilisées sont :

- la chromatographie par échange d'ions (chromatographie liquide basse pression et haute pression (CLHP)) ;
- la chromatographie en phases inverses (CLHP) ;
- la chromatographie sur papier ;
- la chromatographie sur couche mince ;
- la chromatographie en phase gazeuse.

#### 3.2. Dosage

##### 3.2.1. Méthodes applicables à tous les acides aminés

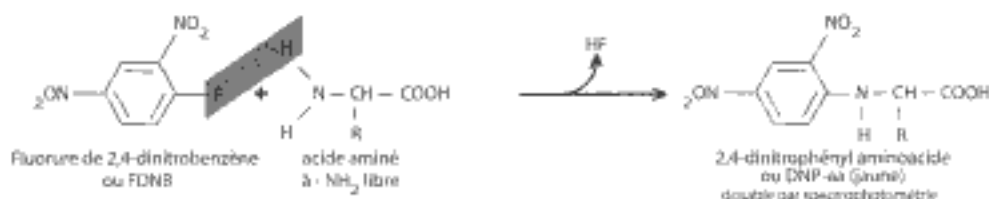
- **Formol-titration de Soerensen**

Titration de l'acide aminé après ajout de formol qui réagit sur l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> : formation d'un dérivé diméthylol ce qui en diminue le pK<sub>a</sub> et permet une mesure du saut de pH.

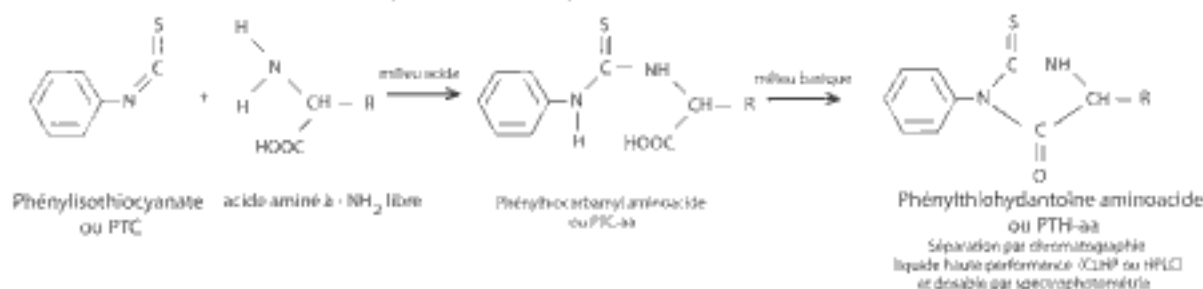
- **Spectrophotométrie d'absorption moléculaire**

Réalisation de réactions colorées et mesure de l'absorbance :

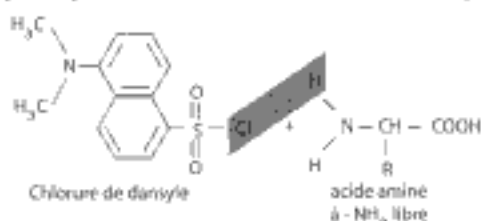
- \* Réaction à chaud avec la ninhydrine (toxique) et mesure de la coloration violette obtenue ;
- \* Réaction avec le FDNB (réactif de Sanger - ancien) ou le réactif d'Edman



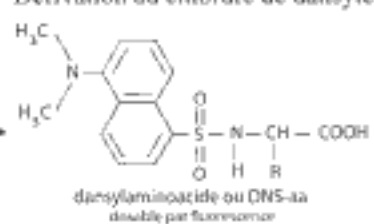
- \* Réaction avec le PTC (réactif d'Edman)



- **Spectrophotométrie d'émission moléculaire (fluorescence)**



- \* Dérivation au chlorure de dansyle



- \* Réaction de Roth (orthophthalate)

Remarque :

Les réactions avec le FDNB, le PTC et le chlorure de dansyle sont également utilisées pour la détermination des groupements N-terminaux et pour le séquençage (PTC) (voir pages suivantes).

##### 3.2.2. Méthodes applicables à un acide aminé ou à un type d'acides aminés

- **Spectrophotométrie à 280 nm pour l'acide aminé aromatique (Tyr)**

- **Réactions colorées spécifiques des chaînes latérales**

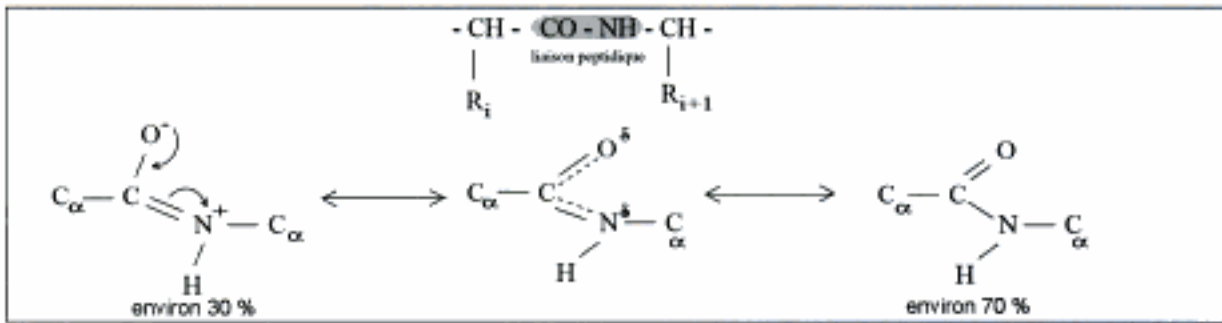
- réaction de Folin - Ciocalteu pour les acides aminés phénoliques (Tyr)
- réaction de Sakaguchi pour Arg (réaction des groupements guanidyl)

## Peptides et protéines

### 1. Structure des peptides et des protéines

#### 1.1. Structure primaire

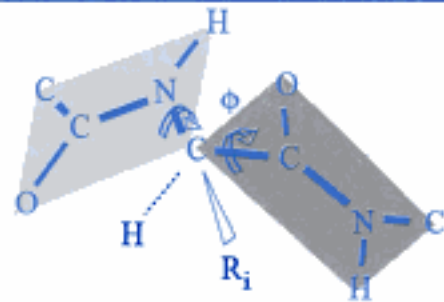
##### 1.1.1. Configuration et représentation de la liaison peptidique



6 atomes coplanaires  $C_{\alpha}$ , C, O, N, H et  $C_{\alpha+1}$

Les C sont, le plus souvent, d'isomérisation E (trans) par rapport à la liaison C - N.

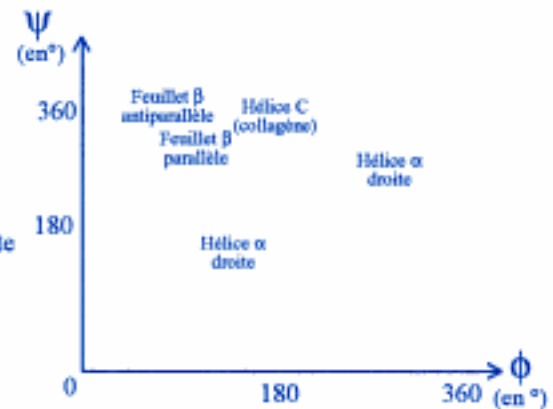
Rotation autour de la liaison C - C (angle  $\phi$ ) et de la liaison C - N (angle  $\psi$ ).



#### Diagramme de Ramachandran

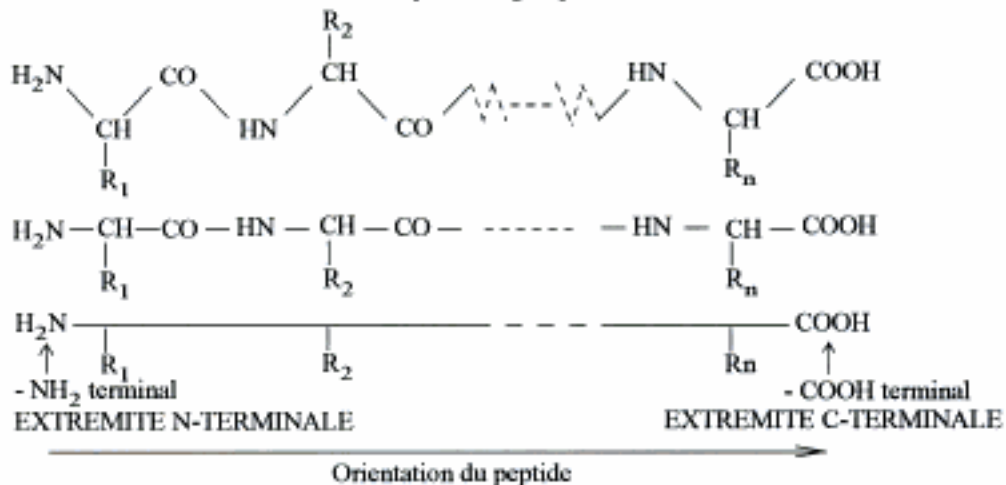
Graphique représentant toutes les configurations possibles en indiquant l'angle  $\psi$  en ordonnées et en abscisses l'angle  $\phi$

Toutes les configurations ne peuvent se réaliser compte tenu de l'encombrement des atomes voisins. Il existe des zones privilégiées permettant la constitution d'hélices et de feuillets pliés (voir ci-après).



Par convention :

- le groupement aminé s'écrit à gauche et le groupement carboxylique à droite ;
- les acides aminés sont numérotés à partir du groupement aminé.



### 1.1.2 Rupture des liaisons peptidiques : diverses modalités

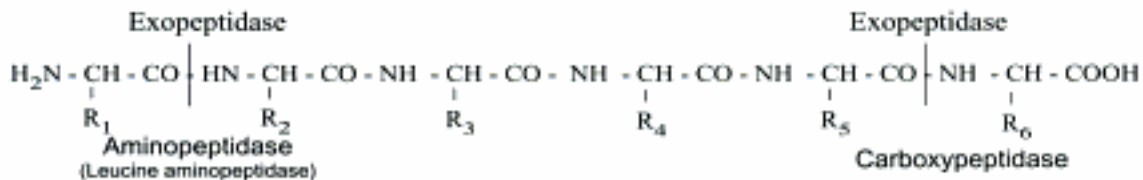
#### ● Hydrolyse chimique de la liaison peptidique



#### ● Hydrolyse enzymatique de la liaison peptidique

La réaction catalysée par une enzyme (peptidase ou protéase) est identique celle de la réaction chimique écrite ci-dessus.

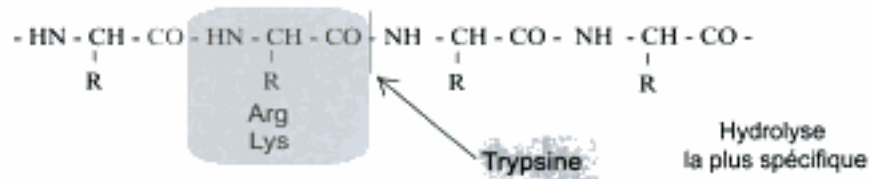
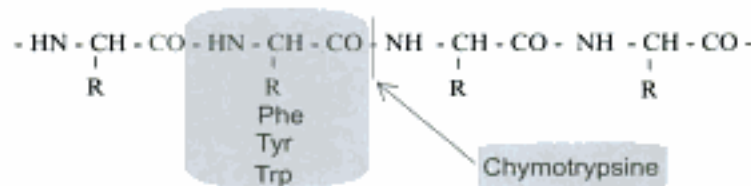
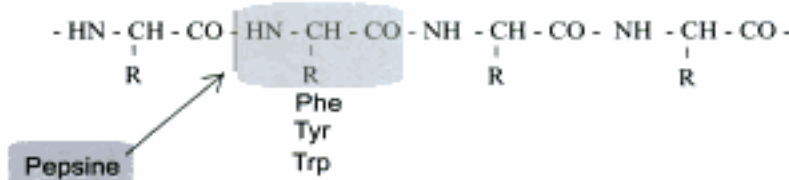
Action d'exopeptidases (enzymes hydrolysant les acides aminés en bout de chaîne peptidique)



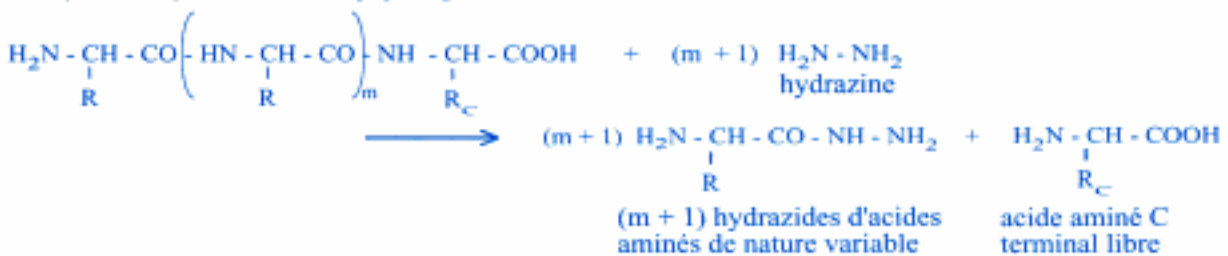
Action d'endopeptidases (enzymes hydrolysant les acides aminés au sein de la chaîne peptidique)

\* Existence d'endopeptidases non spécifiques (pronase, protéase K, ...)

\* Existence d'endopeptidases spécifiques : exemples

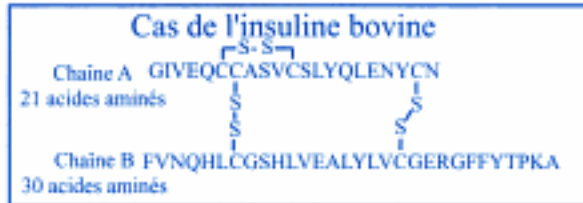


#### ● Hydrazinolyse de la liaison peptidique



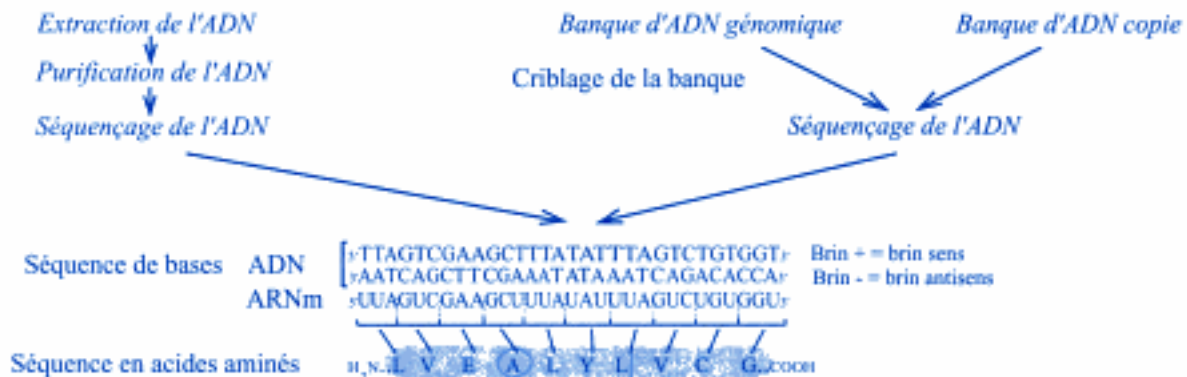
### 1.1.3. Détermination de la structure primaire d'une protéine pure

#### ● Analyse directe de la séquence en acides aminés



|                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Composition totale en acides aminés :</i><br>hydrolyse chimique totale, séparation des acides aminés, dosage :                                                                                                                                          | formule brute : A <sub>3</sub> , C <sub>6</sub> , E <sub>4</sub> , F <sub>3</sub> , G <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> , I <sub>1</sub> , K <sub>1</sub> , L <sub>6</sub> , N <sub>3</sub> ,<br>P <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> , S <sub>3</sub> , T <sub>1</sub> , V <sub>5</sub> , Y <sub>4</sub> |
| <i>Séparation des chaînes peptidiques :</i><br>- Oxydation des ponts disulfure par l'acide performique<br>- Séparation des produits obtenus                                                                                                                | Chaîne A<br>SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>GIVEQCCASVCSLYQLENYCN<br>SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                                                                                                                                                       |
| <i>Détermination des extrémités terminales :</i><br>- Extrémité N terminale : FDNB, réactif d'Edman ou Leucine aminopeptidase<br>- Extrémité C terminale : carboxypeptidase                                                                                | SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA                                                                                                                                                                                                                        |
| <i>Coupe de la chaîne peptidique :</i><br>- Trypsine : coupure après Lys (K) et Arg (R) très spécifique<br>- Chymotrypsine : coupure après Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), ... moins spécifique (coupure parfois "anormale" au niveau de Leu (L) ) par exemple) | Trypsine Chymotrypsine<br>ATTENTION : sites d'hydrolyse atypiques                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <i>Détermination de la séquence des divers fragments :</i><br>- séquençage par la méthode d'Edman<br>- spectrométrie de masse                                                                                                                              | T <sub>1</sub> FVNQHLGSHLVEALYLVCGER C <sub>1</sub> FVNQHLGSHLVEALY<br>T <sub>2</sub> GFFYTPK C <sub>2</sub> LVCGERGFF<br>T <sub>3</sub> A C <sub>3</sub> YTPKA                                                                                                                                                   |
| <i>Reconstitution de la séquence complète par recouvrement</i>                                                                                                                                                                                             | T <sub>1</sub> FVNQHLGSHLVEALYLVCGER<br>C <sub>1</sub> FVNQHLGSHLVEALY LVCGERGFF<br>C <sub>2</sub> LVCGERGFF<br>T <sub>2</sub> GFFYTPK<br>C <sub>3</sub> YTPKA<br>T <sub>3</sub> A<br>FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA                                                                                               |

#### ● Analyse indirecte : analyse de la séquence de bases du gène



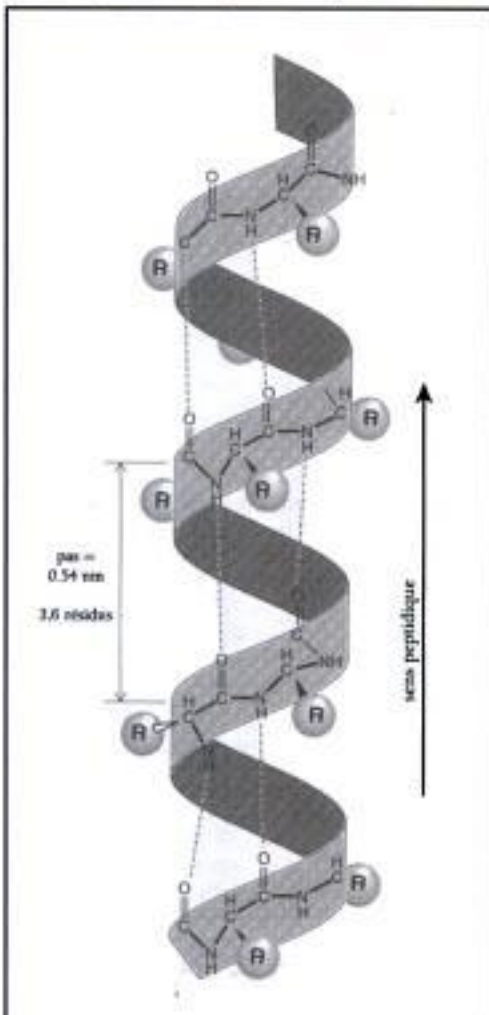


## 1.2. Structure spatiale

### 1.2.1. Structure secondaire

- **Les structures simples** (voir aussi les illustrations couleurs à l'intérieur de la couverture)

2 types de structures simples (hélices et feuillets plissés) sont les premiers à se mettre en place lors du repliement des protéines après leur synthèse ; un troisième (coudes ou boucles) fait le lien entre les deux premiers.



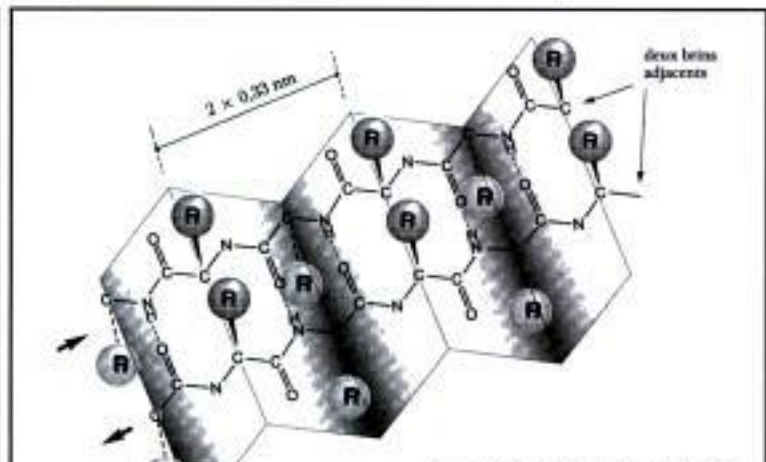
Source : Darlat, Biochimie structurale, (1997), Diderot Editeurs, Paris, p. 192  
Reproduit avec l'aimable autorisation de l'Éditeur

#### Hélice

**Hélice 3,6<sub>13</sub> droite** (hélice  $\alpha$  de Pauling et Corey)

- enroulement droit de la chaîne peptidique en un squelette en hélice ;
  - les chaînes latérales sont externes (souvent hydrophobes) ;
  - pas de l'hélice (nombre d'acides aminés par tour) : 3,6 ;
  - liaisons H entre -CO- et -NH- parallèles à l'axe de l'hélice entre les acides aminés  $i$  et  $i+4$  ;
  - en moyenne 10 résidus par hélice ;
  - acides aminés favorables : petits et non chargés ;
  - acides aminés défavorables : chargés car ils se repoussent ; Pro point de rupture ;
  - du fait de la polarité des liaisons peptidiques, extrémité N terminale chargée positivement et extrémité C terminale chargée négativement ;
- Structure présente, par exemple, dans la partie transmembranaire des protéines.

Autres types d'hélices : hélice  $\alpha$  gauche, 3<sub>10</sub>



Source : Darlat, Biochimie structurale, (1997), Diderot Editeurs, Paris, p. 192  
Reproduit avec l'aimable autorisation de l'Éditeur

#### Feuillets plissés (antiparallèles)

- liaisons hydrogène entre brins peptidiques différents (perpendiculaires au squelette hydrocarboné) : molécule pliée (feuillets) ;
- R de part et d'autre du plan moyen ; sens peptidique identique ou contraire (feuillets parallèles ou antiparallèles).

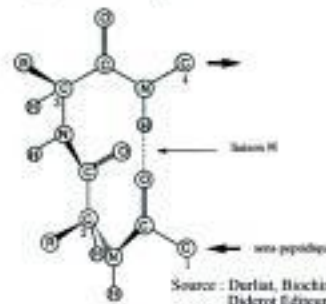
#### Coudes et boucles

Hélices et feuillets des protéines globulaires sont connectés par des boucles ou coudes de conformation non répétitive et irrégulière, de longueur variable (de 2 à 20 acides aminés). Se situent, en général, à la surface des protéines globulaires.

Permettent un changement de direction de la chaîne peptidique.

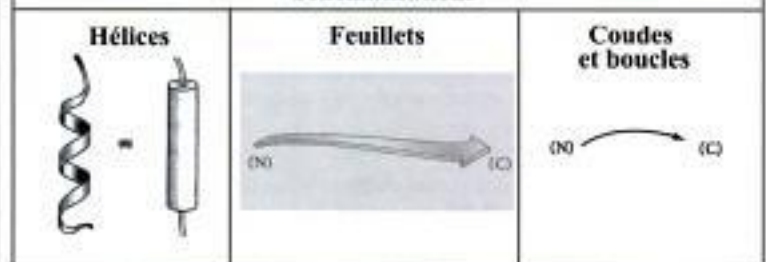
Constitués par des acides aminés hydrophiles qui sont en interaction avec l'eau, à l'extérieur de la protéine alors que les hélices et feuillets constituent le noyau des protéines globulaires.

Exemple : coude  $\beta$  : 4 acides aminés



Source : Darlat, Biochimie structurale, (1997), Diderot Editeurs, Paris, p. 192  
Reproduit avec l'aimable autorisation de l'Éditeur

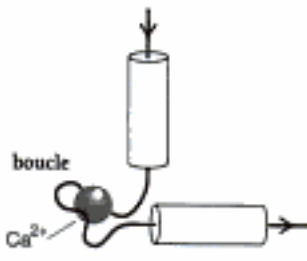
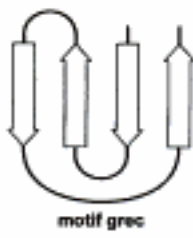
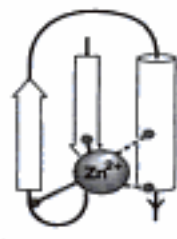
#### Schématisations



Source : Darlat, Biochimie structurale, (1997), Diderot Editeurs, Paris, p. 202  
Reproduit avec l'aimable autorisation de l'Éditeur

### - Les structures supersecondaires : les motifs

Assemblages types (une centaine) de structures secondaires qui se rencontrent au sein de structures tertiaires ; parfois ces motifs sont reliés à des fonctions.

| Motifs d'hélice                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Motifs de feuillets                                                                                           | Motifs mixtes                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Exemple : motif <math>\alpha</math> - <math>\alpha</math><br/>deux hélices <math>\alpha</math> reliées :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* par un coude <math>\beta</math> (fixation de protéines sur l'ADN)</li> <li>* par une boucle peptidique (protéines fixatrices de Ca)</li> </ul>  | <p>Exemple : motif grec</p>  | <p>Exemple : motif "en doigt de zinc" présent dans des protéines qui se fixent sur l'ADN ; comporte des liaisons du métal avec Cys et His</p>  |

Source : Durrant, Biochimie structurale, (1997), Doin Editeurs, Paris, p. 192. Reproduit avec l'aimable autorisation de l'Éditeur

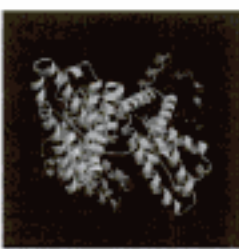



### 1.2.2. Structure tertiaire

- Repliement dans l'espace de la chaîne peptidique.

- Trois types de formes globales : globulaires (sphériques), fibreuses (allongées), transmembranaires.

#### - Protéines globulaires

- Présence de domaines structuraux : globules de structure (et de fonction) stable conservés au cours de l'évolution. Les protéines peuvent être considérées comme des structures modulaires de conformation non rigide.
- Présence d'un centre ("core") hydrophobe (constitué essentiellement d'acides aminés hydrophobes) ; les acides aminés hydrophiles sont plutôt extérieurs.
- Présence de crevasses dans lesquelles se fixent coenzymes et substrat (cas des enzymes).

| Protéines à domaine $\alpha$                                                        | Protéines à domaine $\beta$                                                         | Protéines à domaine $\alpha/\beta$                                                   | Protéines à domaine $\alpha+\beta$                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| uniquement constituées d'hélices $\alpha$                                           | noyau constitué de 4 à 10 feuillets $\beta$ antiparallèles ; centre hydrophobe      | feuillets $\beta$ (centraux) entourés d'hélices $\alpha$                             | hélices et feuillets plissés fortement imbriqués dans la même molécule                |
| sérumalbumine<br>code pdb : 1AO6<br>voir " Bioinformatique "                        | inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase<br>code pdb : 1HOE<br>voir " Bioinformatique "   | phosphofructokinase<br>code pdb : 1PFK<br>voir " Bioinformatique "                   | green fluorescent protein<br>code pdb : 1EMA<br>voir " Bioinformatique "              |
|  |  |  |  |

(voir les illustrations couleurs à l'intérieur de la couverture)

#### - Protéines fibreuses

Agrégats ordonnés de molécules élémentaires qui sont toutes sous une forme unique de conformation qui normalement n'existent pas isolées ; périodicité de séquence ; réticulation ; exemples : kératines, collagènes, (hélices triples), fibroïnes, ...

#### - Protéines transmembranaires

Protéines incluses au moins partiellement dans la double couche lipidique de la membrane.

- Protéines monotopiques (ne traversent pas la membrane, par exemple, récepteurs) / polytopiques (traversent la membrane, par exemple, transporteurs) ;
- Le plus souvent, hélice  $\alpha$  de 20 résidus hydrophobes ou polaires non chargés plus quelques résidus chargés pour maintenir la structure ou accomplir la fonction.

### 1.2.3. Structure quaternaire

- Existence de sous-unités (nombre pair) liées par des liaisons non covalentes.

- Géométrie spatiale bien définie (symétrie) : structure oligomérique ; association / dissociation comme moyen de contrôle.

- Association obligatoire pour les propriétés biologiques ; interactivité entre les sous-unités comme moyen de régulation (allostérie).

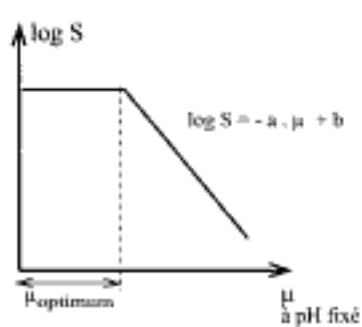
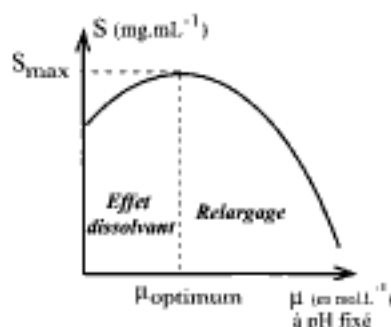
## 2. Propriétés des peptides et des protéines

### 2.1. Propriétés physicochimiques

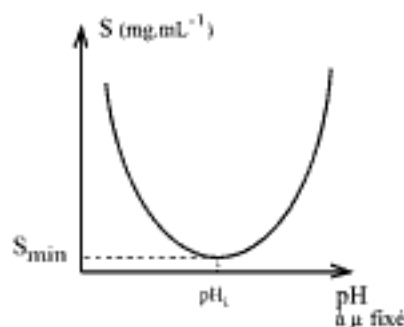
#### 2.1.1. Solubilité (notée S) :

Les protéines sont solubles à faible **concentration saline** ou faible force ionique (*effet dissolvant* ou "salting in"). Par contre, les protéines sont, en général, insolubles dans ces mêmes solutions salines concentrées (*relargage* ou "salting out"). La **température** augmente la solubilité des protéines en deçà de la température de dénaturation. Les **solvants organiques** (acétone, alcools) insolubilisent les protéines (diminution de la constante diélectrique du milieu, d'où augmentation des interactions électrostatiques) avec risque de dénaturation.

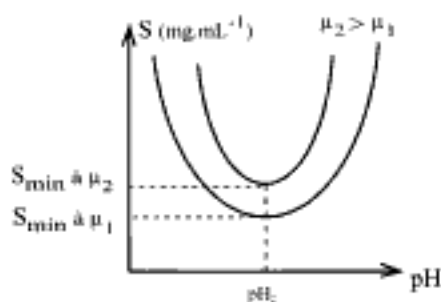
*Influence de la concentration en sels (force ionique notée  $\mu$ )*



*Influence du pH*



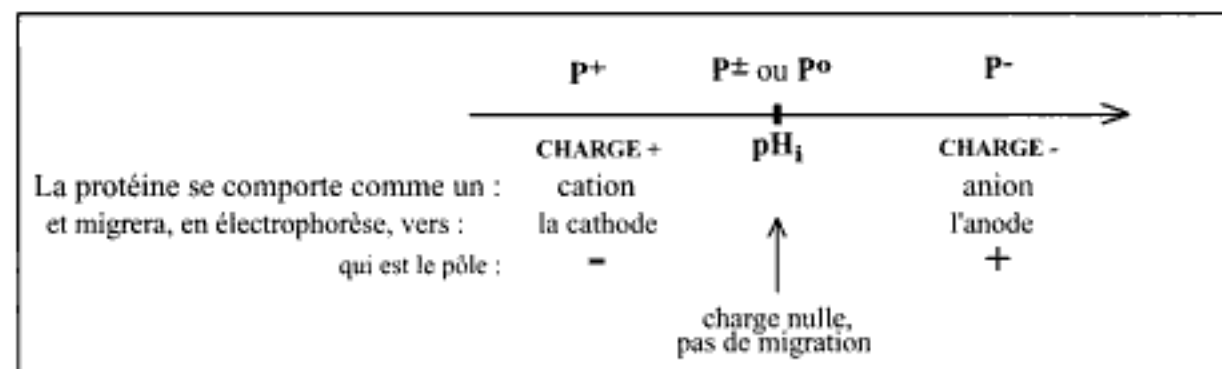
*Influence du pH et de la force ionique (dans la zone de relargage)*



#### 2.1.2. Propriétés électriques

Les protéines, polymères d'acides aminés sont porteuses de charges électriques variables en fonction du pH.

Chaque protéine possède un pH isoélectrique ( $pH_i$ ) pour lequel la mobilité dans un champ électrique (mobilité électrophorétique) est nulle : charge globale de la protéine nulle.



Remarque : par analogie avec ce qui a été défini pour les acides aminés, on parle de protéines "acides" (riches en acides aminés acides, donc de  $pH_i$  acide), de protéines "basiques" (riches en acides aminés basiques, donc de  $pH_i$  basique) et de protéines "neutres".

## 2.2. Propriétés physiques

- **Sédimentation**
- **Propriétés optiques** importantes pour l'étude et le dosage des protéines en rapport avec :
  - la concentration de la solution (indice de réfraction, absorption, diffusion) ;
  - la taille et la forme de la molécule (diffusion) ;
  - la structure (pouvoir rotatoire, absorption à 280 nm, diffraction des rayons X par les cristaux).
- **Viscosité**
- **Masse molaire** : elle se détermine par utilisation :
  - de la chromatographie de gel filtration ;
  - de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS ("SDS-PAGE" des anglosaxons) ;
  - du calcul à partir de la séquence des acides aminés ou du gène ;
  - de la mesure de la pression osmotique (ancien) ;
  - de la diffusion de la lumière (recherche) ;
  - de l'ultracentrifugation.

## 2.3. Propriétés chimiques

### 2.3.1. Propriétés de la liaison peptidique

- Hydrolyse de la liaison peptidique



- Action d'exopeptidases et d'endopeptidases : voir le paragraphe 1.1.2.
- Réaction du biuret : coloration violette en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  en milieu alcalin ; utilisation pour la caractérisation et le dosage des protéines.

### 2.3.2. Interactions des protéines avec des ligands

- Liaisons plus ou moins spécifiques entre les protéines et un ou plusieurs ligands (en général, ions, petites molécules organiques ou macromolécules).
- Ces interactions spécifiques conduisent à la formation d'un complexe (non covalent) protéine ligand ; ceci peut permettre, par exemple, le transport du ligand (cas de la sérumalbumine).
- La fixation du ligand peut s'accompagner, au sein de la protéine, de modifications structurales responsables de l'activité biologique (voir ci-dessous) via la modification d'autres interactions avec des ligands différents, d'où association / dissociation, présence / absence d'activité enzymatique, ...

### 2.3.3. Propriétés des chaînes latérales

Réactivité de chaînes latérales porteuses de groupements fonctionnels comme le groupement phénol (Tyr) ; utilisation pour la caractérisation et le dosage des protéines par des réactions colorées.

## 2.4. Propriétés biologiques

En plus de leur intervention comme structures cellulaires (cytosquelette, fuseau achromatique, ...) les protéines sont douées d'activités particulières.

| Type de molécule              | Enzyme                                                                                             | Anticorps ou antigène       | Récepteur hormonal                                                                                                                                                                                                                   | Protéine d'un système de signalisation                                                                                                        |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Type d'activité               | catalyseur                                                                                         | réaction immunitaire        | régulation de l'activité cellulaire :<br>étape de fixation de l'hormone                                                                                                                                                              |                                                                                                                                               |
| Ligand                        | substrat                                                                                           | antigène ou anticorps       | hormone                                                                                                                                                                                                                              | étape ultérieure d'une chaîne de signalisation<br>élément d'un système de signalisation (second messenger, $\text{Ca}^{2+}$ , protéines, ...) |
| Nature et devenir du complexe | complexe enzyme substrat ;<br>modification de structure d'où transformation du substrat en produit | complexe antigène anticorps | complexe hormone récepteur ou protéine régulatrice ligand ;<br>modification de structure qui entraîne une modification des propriétés (catalyse ou possibilité d'interactions avec d'autres molécules d'une chaîne de signalisation) |                                                                                                                                               |

### 3. Dosage des peptides et des protéines

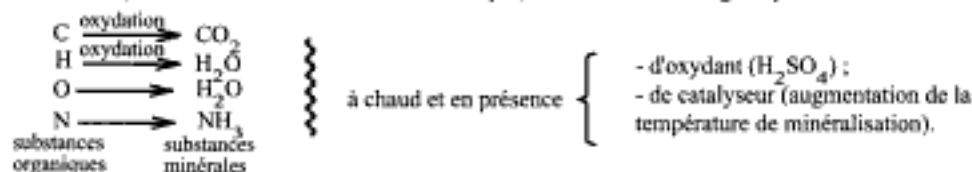
#### 3.1. Méthodes gravimétriques

- Dénaturation des protéines, précipitation dans des conditions optimales et mesure de la masse du précipité.
- Méthodes longues, peu sensibles mais exactes.

#### 3.2. Méthodes volumétriques : méthode de Kjeldahl

##### \* Minéralisation

- Transformation (à chaud et en milieu acide sulfurique) des substances organiques en substances minérales.



- En fin de minéralisation, solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans l'acide sulfurique concentré.

##### \* Dosage des ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ )

- Décomposition du sulfate d'ammonium par l'hydroxyde de sodium et formation d'ammoniac hydraté en ammoniacque



- Entraînement de l'ammoniacque par la vapeur d'eau ; condensation dans un réfrigérant, recueil et titrage (direct ou indirect) de la solution d'ammoniacque, d'où obtention de  $C_N$  en g de N.  $\text{L}^{-1}$ .

##### \* Calculs

Si on admet (cas général) que l'azote représente une moyenne de 16 % de la masse des protéines, la concentration

C en protéines sera  $C = \frac{100}{16} \cdot C_N$  soit  $6,25 \cdot C_N$

### 3.3. Méthodes optiques

#### 3.3.1. Méthodes réfractométriques

L'indice de réfraction d'une solution protéique varie en fonction de sa concentration.

#### 3.3.2. Méthodes turbidimétriques, opacimétriques et néphélométriques

- *Opacimétrie* : mesure de la lumière transmise à travers une suspension.
- *Turbidimétrie* : mesure de la lumière transmise suite à pertes par réflexion et réfraction.
- *Néphélométrie* : mesure de la lumière diffusée.

#### 3.3.3. Méthodes colorimétriques

|                                     | biuret                                                                                                                                                         | Lowry                                                                                                                                                                                                               | bicinchoninate (BCA)                        | Bradford                                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Principe</b>                     | - complexation de $\text{Cu}^{2+}$ en milieu alcalin par les liaisons peptidiques                                                                              | - biuret<br>- coloration des Tyr                                                                                                                                                                                    | - biuret<br>- complexation de $\text{Cu}^+$ | - fixation de bleu de Coomassie sur les zones hydrophobes |
| <b>Réactif</b>                      | - $\text{CuSO}_4$ , $\text{NaOH}$ , tartrate de Na et K en milieu alcalin                                                                                      | - biuret<br>- réactif de Folin                                                                                                                                                                                      | - biuret<br>- bicinchoninate                | - bleu de Coomassie G 250                                 |
| <b><math>\lambda</math> lecture</b> | 530 nm                                                                                                                                                         | 600 - 750 nm                                                                                                                                                                                                        | 562 nm                                      | 595 nm                                                    |
| <b>Qualités</b>                     | - limite de détection élevée (méthode moins performante)<br>- facile à mettre en oeuvre<br>- <b>coloration indépendante de la composition en acides aminés</b> | - <b>coloration dépendante de la composition en acides aminés</b><br>- limites de détection beaucoup plus faibles (méthodes plus performantes)<br>- interférences parfois nombreuses (sulfate d'ammonium, SDS, ...) |                                             |                                                           |

#### 3.3.4. Méthodes spectrophotométriques

- Absorbance caractéristique des protéines à 280 nm (acides aminés aromatiques). L'absorbance des protéines à 280 nm varie d'une protéine à l'autre en fonction du pourcentage d'acides aminés aromatiques.

- Pour une solution pure, on peut déterminer (expérimentalement et théoriquement) un coefficient d'absorption molaire  $\epsilon_M$  :

$$\epsilon_M = 5000 \cdot \eta_{(Tyr)} + 1490 \cdot \eta_{(Trp)} + 125 \cdot \eta_{(S-S)} \quad (\text{en } \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \quad \text{avec } \eta_{(X)} : \text{nombre de X dans la protéine.}$$

Dans ce cas, la détermination de la concentration se réduit alors à une simple mesure d'absorbance.

### 3.4. Méthodes immunologiques

Immunodiffusion radiale et électro-immunodiffusion radiale, immunoprécipitation en milieu liquide : méthodes permettant le dosage de très petites quantités de protéines (hormones dans les milieux biologiques). Dosage radio-immunologique (RIA) ; immuno-enzymologie.

## 4. Extraction - purification des protéines ; contrôles de pureté des protéines

### 4.1. Définitions

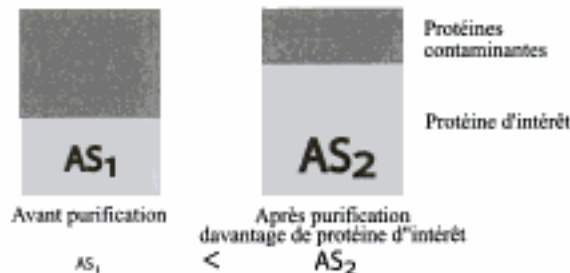
**Extraction** : mise en solution d'une protéine emprisonnée dans une structure biologique (tissu, cellule, organite, membrane, ...) et obtention d'un **extrait brut** après séparation liquide - solide.

**Purification** : élimination des protéines contaminantes d'où l'augmentation de l'activité spécifique AS (activité ramenée à l'unité de masse de protéines)

**Enrichissement (E) ou degré de purification**

rapport de l'activité spécifique après purification  
 $AS_2$  à l'activité spécifique avant purification  $AS_1$  :  
 $E = AS_2 / AS_1$

Pour l'unité de masse de la solution protéique



L'unité de masse de la solution protéique contient davantage de protéine d'intérêt après purification (état 2) qu'avant (état 1). L'enrichissement correspond à l'augmentation de la proportion de la protéine d'intérêt par rapport aux protéines totales.

**Rendement (R) ou pourcentage de récupération**

rapport de l'activité totale après purification  
 $AT_2$  à l'activité totale avant purification  $AT_1$ .  
 Le taux de rendement s'exprime en pourcentage :  
 $R = (AT_2 / AT_1) \cdot 100$

Lors d'une opération de purification, il est impossible de récupérer toute la protéine d'intérêt (pertes inévitables lors des opérations techniques). De plus, il peut y avoir des pertes d'activité. Plus les étapes de purification sont nombreuses, plus grandes sont ces pertes. Le taux de rendement permet de les quantifier.

### 4.2. Extraction

#### Méthodes physiques

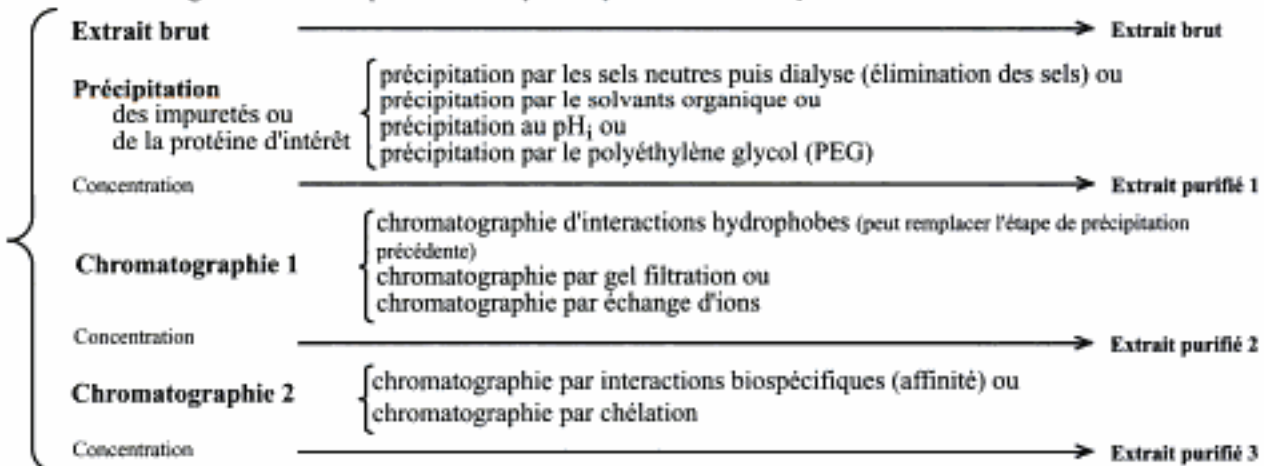
Broyage, usage des ultra-sons, usage d'abrasifs, compression et extrusion, homogénéisateurs à piston, congélation / décongélation, choc osmotique, ...

#### Méthodes chimiques et biologiques

Enzymes lytiques (lysozyme pour les bactéries), traitements chimiques (dénaturation des parois (EDTA) ou agents chaotropiques (guanidine, urée, éthanol, ...)), détergents (solubilisation des membranes (SDS, Triton X, Brij, ...)), solvants organiques (solubilisation des membranes), ...

### 4.3. Purification

Démarche générale et exemples de techniques de purification d'une protéine



### 4.4. Techniques et contrôles de pureté biochimiques

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (Sodium dodécyl sulfate) ("SDS-PAGE")
- Focalisation isoélectrique
- Ultracentrifugation
- Spectre de résonance magnétique nucléaire (spectre RMN)
- Composition en acides aminés
- Séquençage

Remarque : utilisation, également, de critères d'ordre immunologique et d'ordre biologique.

## Interactions protéine ligand

Les protéines peuvent fixer de manière plus ou moins spécifique, c'est-à-dire de manière plus ou moins solide, divers types de substances dénommées "ligand" avec formation d'un **complexe protéine ligand de nature non covalente**. Ces interactions ont souvent pour effet de modifier la structure, c'est-à-dire les propriétés de la protéine. Ceci permet d'expliquer les propriétés biologiques des protéines : enzyme, récepteur hormonal, protéine régulatrice, ...

### 1. Exemples

Voir paragraphe " Propriétés biologiques des protéines ".

### 2. Modélisation de la fixation d'un ligand L sur un site récepteur R

La modélisation selon Scatchard consiste à considérer :

- une protéine P possédant n récepteurs R par mole de protéine (**n sites de fixation du ligand par mole de protéine**) ;

- l'équilibre :



avec les constantes d'équilibre d'association  $K_A$  et de dissociation  $K_D$  :

$$K_A = \frac{[R L]}{[R] \cdot [L]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{1}{K_D}$$

Si  $[R_T]$  est la concentration totale du récepteur,

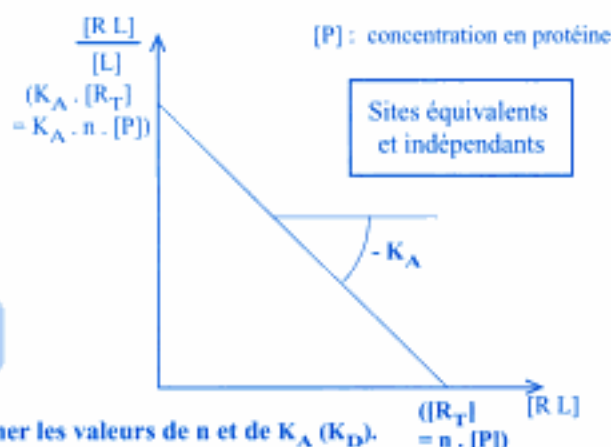
$$[R_T] = [R] + [R L] :$$

$$K_A = \frac{[R L]}{([R_T] - [R L]) \cdot [L]}$$

ce qui permet d'obtenir l'expression :

$$\frac{[R L]}{[L]} = K_A \cdot [R_T] - K_A \cdot [R L]$$

$$\frac{[R L]}{[L]} = \frac{1}{K_D} \cdot [R_T] - \frac{1}{K_D} \cdot [R L]$$

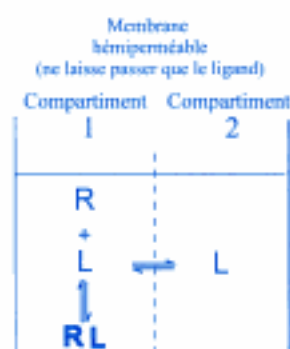
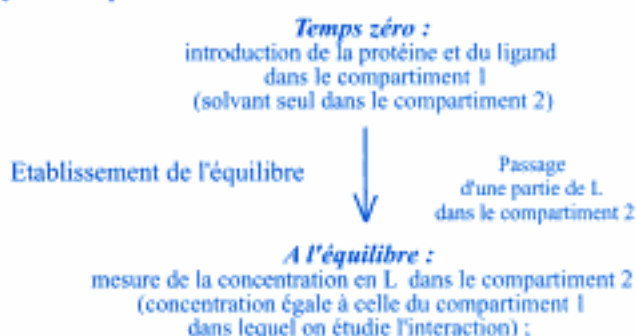


La représentation graphique permet de déterminer les valeurs de n et de  $K_A$  ( $K_D$ ).

Remarque : dans le cas de sites non équivalents et non indépendants, la représentation précédente montre une rupture de pente.

### 3. Techniques d'étude

#### 3.1. Dialyse à l'équilibre



D'autres séries de mesures sont réalisées avec la même concentration en protéine et des concentrations initiales en ligand différentes.

#### 3.2. Autres techniques

\* Utilisation d'une propriété différentielle entre ligand libre et ligand lié : spectrophotométrie (HABA), fluorescence (NADH), ...

\* Dosage direct d'une des deux formes après séparation de la forme liée et de la forme libre (radioactivité).

## Enoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

### Acides aminés

#### Exercice 1 Ionisation de la proline

1. Ecrire les équations d'ionisation successives de la proline, connaissant :  
 $pK_{a1} = 1,99$                        $pK_{a2} = 10,6$
2. Mettre en évidence le zwitterion.
3. Calculer le  $pH_i$  de la proline.

#### Exercice 2 Ionisation de l'acide aspartique

1. Ecrire les équations d'ionisation successives de l'acide aspartique, connaissant :  
 $pK_{a1} = 2,09$                        $pK_{a2} = 9,82$                        $pK_{aR} = 3,86$
2. Mettre en évidence le zwitterion.
3. Calculer le  $pH_i$  de l'acide aspartique.
4. Calculer les proportions des différentes formes ioniques en présence au  $pH_i$ .

#### Exercice 3 Ionisation de la lysine

1. Ecrire les équations d'ionisation successives de la lysine, connaissant :  
 $pK_{a1} = 2,18$                        $pK_{a2} = 8,95$                        $pK_{aR} = 10,5$
2. Mettre en évidence le zwitterion.
3. Calculer le  $pH_i$  de la lysine.
4. Calculer les proportions des différentes formes ioniques en présence, pour les pH suivants :  
 $pH = pK_{a1}$ ,       $pH = pK_{a1}+1$ ,       $pH = pK_{a1}-1$ ,       $pH = pK_{a1}+2$ ,       $pH = pK_{a1}-2$ ,  
 $pH = pK_{a2}$ ,       $pH = pK_{a2}+1$ ,       $pH = pK_{a2}-1$ ,       $pH = pK_{a2}+2$ ,       $pH = pK_{a2}-2$ ,  
 $pH = pK_{aR}$ ,       $pH = pK_{aR}+1$ ,       $pH = pK_{aR}-1$ ,       $pH = pK_{aR}+2$ ,       $pH = pK_{aR}-2$ ,  
 $pH = pH_i$        $pH = pH_i+1$ ,       $pH = pH_i-1$ .
5. Etablir les courbes de prédominance : pourcentage des formes en présence en fonction du pH, sur un même graphique, pour les quatre formes ioniques de la lysine.

#### Exercice 4 Ionisation de l'histidine

1. Ecrire la formule développée de l'histidine, ainsi que les différentes formes ioniques possibles de cet acide aminé.
2. Calculer le  $pK_{aR}$  du groupement ionisable de la chaîne latérale de l'histidine, sachant que le groupement  $\alpha$ -COOH a un  $pK_{a1} = 1,82$ , le groupement  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> un  $pK_{a2} = 9,17$  et que le  $pH_i = 7,59$ .
3. L'histidine est-elle susceptible d'exercer un pouvoir tampon à  $pH = 6$  ? Justifier la réponse.

#### Exercice 5 Dosage pH-métrique de la lysine

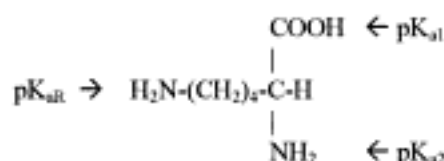
On réalise la courbe de titrage d'une solution aqueuse de lysine par une solution d'acide chlorhydrique à  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ .

1. A partir des résultats expérimentaux donnés dans le tableau ci-après, où  $V_{HCl}$  représente le nombre de mL de solution d'HCl à  $0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ , tracer la courbe de titrage  $pH = f(V_{HCl})$ .

|                 |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $V_{HCl}$ en mL | 0,00 | 1,00 | 2,00 | 3,00  | 4,00  | 5,00  | 6,00  | 7,00  | 8,00  | 9,00  |
| pH              | 9,74 | 9,68 | 9,52 | 9,29  | 9,10  | 8,91  | 8,72  | 8,52  | 8,25  | 7,77  |
| $V_{HCl}$ en mL | 9,50 | 9,60 | 9,70 | 10,00 | 11,00 | 12,00 | 13,00 | 14,00 | 15,00 | 16,00 |
| pH              | 6,97 | 5,65 | 4,16 | 3,54  | 2,95  | 2,66  | 2,44  | 2,25  | 2,07  | 1,88  |



2. Ecrire l'équation de la réaction précisant quelle fonction de la lysine est dosée lors du saut de pH, sachant que le pH<sub>i</sub> de la lysine est égal à 9,74.
  3. Déterminer le volume équivalent  $V_{eq}$  et calculer la concentration de la solution de lysine, sachant que l'on opère sur une prise d'essai de 20,00 mL de solution de lysine.
  4. Déterminer et calculer les 3  $pK_a$  des groupements ionisables de la lysine ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>,  $\alpha$ -COOH et  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>).
- Donnée : structure de la lysine.



### Exercice 6 Dosage pH-métrique de la glycine

On se propose de doser une solution de glycine par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à une concentration de 0,140 mol.L<sup>-1</sup> et à l'aide d'un montage pH-métrique.

La glycine en solution est un mélange des formes glycine<sup>-</sup> et glycine<sup>±</sup> (forme isoélectrique) et la méthode de dosage comprend deux étapes :

- **étape 1.** On met en œuvre une pH-métrie classique et on note la variation du pH en fonction du volume  $V_{\text{NaOH}}$  (en mL) de NaOH ajouté. La prise d'essai de la solution de glycine est de 10,00 mL et les résultats expérimentaux obtenus figurent dans le tableau ci-après :

|                         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $V_{\text{NaOH}}$ en mL | 0,00 | 1,00 | 2,00 | 3,00 | 4,00 | 4,50 | 4,75 | 5,00 | 5,25 | 5,50 | 6,00 | 7,00 | 8,00 |
| pH                      | 2,04 | 2,28 | 2,52 | 2,78 | 3,15 | 3,49 | 3,80 | 5,97 | 8,14 | 8,45 | 8,79 | 9,16 | 9,42 |

1. Représenter la courbe  $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}} \text{ ajouté})$  en prévoyant une graduation des abscisses jusqu'à un volume de 16,00 mL (voir question 3) et déterminer le volume équivalent  $V_{eq}$ .
2. Que se passe-t-il au cours de cette étape ? Quel est le but de cette étape ?

- **étape 2.** On opère comme pour l'étape 1, mais à la prise d'essai de 10,00 mL de glycine, on ajoute ( $V_{eq} + 1$ ) mL de NaOH à 0,140 mol.L<sup>-1</sup> et du formaldéhyde neutralisé. Les résultats expérimentaux obtenus figurent dans le tableau ci-après :

|                         |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $V_{\text{NaOH}}$ en mL | 6,00  | 7,00  | 8,00  | 9,00  | 10,00 | 11,00 | 11,50 | 12,00 |
| pH                      | 5,39  | 5,76  | 6,02  | 6,26  | 6,50  | 6,80  | 7,01  | 7,35  |
| $V_{\text{NaOH}}$ en mL | 12,25 | 12,75 | 13,00 | 13,25 | 13,50 | 14,00 | 15,00 | 16,00 |
| pH                      | 7,67  | 9,84  | 10,14 | 10,31 | 10,43 | 10,61 | 10,82 | 11,02 |

N.B. Les volumes de NaOH figurant dans le tableau incluent les ( $V_{eq} + 1$ ) mL de NaOH ajoutés avant d'effectuer les mesures.

3. Représenter la courbe  $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}} \text{ ajouté})$  sur le même graphique que précédemment (voir question 1) et déterminer le volume équivalent  $V'_{eq}$ .
4. Que se passe-t-il au cours de cette étape ? Quelle est la concentration de la solution de glycine à doser exprimée en mol.L<sup>-1</sup> ? Quel est le rapport [glycine<sup>-</sup>] / [glycine<sup>±</sup>] dans le mélange à doser ?

### Exercice 7 Pouvoir rotatoire de la L-alanine

Une solution de L-alanine a un pouvoir rotatoire de + 0,36°. La longueur du tube polarimétrique est de 10 cm. Le pouvoir rotatoire spécifique de la L-alanine,  $[\alpha]_D^{20^\circ}$  est égal à + 1,8°.

Quelle est la concentration de la solution de L-alanine exprimée en mol.L<sup>-1</sup> ?

Donnée : masse molaire moléculaire de la L-alanine : 89 g.mol<sup>-1</sup>.

### Exercice 8 Etude d'un mélange d'acides aminés

Une solution renferme de la glycine (Gly), de l'isoleucine (Ile) et du tryptophane (Trp).

- Pour la technique de formol-titration de Soerensen (voir résumé du cours), il faut ajouter 30,00 mL d'une solution de NaOH à 0,100 mol.L<sup>-1</sup> pour obtenir l'équivalence.
- Le pouvoir rotatoire de la solution initiale, mesuré dans un tube polarimétrique de 20 cm est égal à - 1,05°.
- L'absorbance de la solution initiale diluée au 1/1000 est de 0,560 à 280 nm.

Déterminer les concentrations en Gly, Ile et Trp de la solution. Toutes ces concentrations sont à exprimer en mol.L<sup>-1</sup>.

Données :

$$[\alpha]_D^{20^\circ} \text{ Ile} = +12,4^\circ \text{ et } [\alpha]_D^{20^\circ} \text{ Trp} = -33,7^\circ ;$$

- Le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$  molaire ou  $\epsilon_M$ ) de l'acide aminé absorbant à 280 nm est de 5600 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> ;
- Les masses molaires moléculaires de Ile et de Trp sont respectivement de 131 et 204 g.mol<sup>-1</sup>.

## Peptides

### Exercice 9 Alanine et dérivés peptidiques

Soit l'alanine (Ala) et les dérivés peptidiques suivants :

| Acide aminé ou peptides                           | pK <sub>a1</sub> | pK <sub>a2</sub> |
|---------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Ala                                               | 2,34             | 9,69             |
| H <sub>2</sub> N-Ala-Ala-COOH                     | 3,12             | 8,80             |
| H <sub>2</sub> N-Ala-Ala-Ala-COOH                 | 3,39             | 8,03             |
| H <sub>2</sub> N-Ala-(Ala) <sub>n</sub> -Ala-COOH | 3,42             | 7,94             |

- Nommer les deux groupements ionisables de l'alanine.
- Soit le peptide : H<sub>2</sub>N-Ala-Ala-COOH
  - Donner la formule développée de ce peptide.
  - Mettre en évidence la liaison peptidique.
  - Le titrage de ce peptide montre qu'il y a ionisation de deux groupements seulement. Mettre en évidence les groupements ionisables responsables du pK<sub>a1</sub> et du pK<sub>a2</sub> de ce peptide.
- Calculer le pI<sub>i</sub> de l'alanine et de chacun des peptides dérivés. Conclure.

### Exercice 10 Peptides. Variation de la charge en fonction du pH

Soit les peptides : Lys-Ala-His-Glu-Met et Trp-Leu-Asp-Cys. Ecrire la formule développée de ces peptides. Etudier la variation de leur charge nette en fonction du pH et déterminer leur pI<sub>i</sub>.

On utilisera les valeurs approximatives suivantes pour le pK<sub>a</sub> des différentes fonctions ionisables :

| Groupe ionisable | α-COOH | β ou γ-COOH | α-NH <sub>2</sub> | ε-NH <sub>2</sub> | imidazole | thiol |
|------------------|--------|-------------|-------------------|-------------------|-----------|-------|
| pK <sub>a</sub>  | 3,0    | 4,5         | 8,5               | 10,5              | 6,5       | 10    |

### Exercice 11 Etude d'un dipeptide P. Variation de la charge en fonction du pH

- Ecrire la formule développée du dipeptide P ou alanyl-tyrosine.
- Préciser les différentes formes ioniques possibles du dipeptide P (formules développées non demandées) en fonction du pH du milieu. On donne les valeurs des pK<sub>a</sub> à 25°C :

| Acide aminé | pK <sub>a1</sub> (α-COOH) | pK <sub>a2</sub> (α-NH <sub>2</sub> ) | pK <sub>aR</sub> (chaîne latérale) |
|-------------|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Tyrosine    | 2,20                      | 9,10                                  | 10,1                               |
| Alanine     | 2,35                      | 9,70                                  | /                                  |

N.B : on supposera, en première approximation, que les pK<sub>a</sub> des groupements ionisables sont identiques dans l'acide aminé libre et dans le peptide P.

- Dans une cuve de 1 cm de trajet optique, on mesure l'absorbance " A " à 25°C et à 295 nm d'une solution d'alanyl-tyrosine à 0,4 mmol.L<sup>-1</sup> en fonction du pH du milieu. On obtient les résultats suivants :

| pH                        | 1,3   | 4,6   | 8,0   | 9,7   | 10,2  | 10,5  | 12,0  | 13,0  | 14,0  |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance " A " à 295 nm | 0,000 | 0,014 | 0,075 | 0,300 | 0,548 | 0,684 | 0,865 | 0,912 | 0,912 |

Tracer et interpréter la courbe absorbance = f (pH). En déduire un paramètre physico-chimique du dipeptide P. Calculer le coefficient d'absorption molaire du dipeptide P en milieu alcalin.

### Exercice 12 Séquence d'un térapeptide

Après hydrolyse trypsique partielle d'un polypeptide, on isole un térapeptide dont la composition en acides aminés est la suivante : Tyr, Arg, Cys et Glu.

L'acide aminé N-terminal a un rôle important dans la formation des ponts covalents intra- et inter-chaînes des protéines. L'acide aminé suivant migre plus près de l'anode à pH = 8,5 que les autres acides aminés de ce térapeptide.

- Indiquer comment on obtient la composition en acides aminés d'un peptide.
- Indiquer comment on détermine la nature de l'acide aminé N-terminal.
- Donner la séquence du térapeptide en expliquant la démarche suivie.

**Exercice 13** Analyse d'un peptide

1. Comment peut-on mettre en évidence la nature peptidique du composé étudié ?
2. L'hydrolyse acide totale et l'analyse chromatographique sur couche mince révèlent que le peptide est constitué par les acides aminés suivants : Arg, Ala, Val, Leu, Phe et Tyr. Quel révélateur peut être utilisé pour localiser les acides aminés sur le chromatogramme ? Comment peut-on révéler spécifiquement l'arginine ?
3. On détermine la masse molaire moléculaire du peptide, ainsi que sa formule brute. Citer une technique permettant d'établir à la fois la formule brute et la masse molaire moléculaire. Les résultats obtenus montrent qu'il s'agit d'un hexapeptide, chaque acide aminé cité à la question 2 est présent en un seul exemplaire.
4. Différentes stratégies sont développées pour établir la séquence du peptide :
  - La méthode à l'aminopeptidase permet de caractériser l'alanine ;
  - L'hydrolyse trypsique conduit à 2 tripeptides. L'un d'entre eux est constitué par les acides aminés suivants : Ala, Arg, Tyr ;
  - L'hydrolyse partielle conduit à un mélange de peptides : peptide P<sub>1</sub> constitué d'Arg et Phe, peptide P<sub>2</sub> constitué de Leu et Val et peptide P<sub>3</sub> constitué de Phe, Leu et Arg.

En déduire la séquence du peptide.

**Exercice 14** Structure primaire d'une séquence polypeptidique

La détermination de la structure primaire d'un peptide de 13 acides aminés est réalisée de deux manières différentes. Préalablement, la composition totale en acides aminés est déterminée par hydrolyse acide totale.

**A - Hydrolyse acide totale et détermination de la formule brute du peptide**

L'hydrolyse chimique totale du peptide est réalisée en milieu acide (HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>) en tubes scellés sous azote durant 24 h, 36 h et 48 h. A l'issue de chacune de ces hydrolyses, les divers acides aminés présents sont dosés.

1. Donner le principe d'une méthode de dosage susceptible d'être utilisée

Pour chaque acide aminé, le nombre de picomoles d'acide aminé trouvé est ramené au nombre de picomoles de peptides soumis à hydrolyse. Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

| Acide aminé | Rapport des quantités d'acide aminé à la quantité de peptide hydrolysé |                  |                  |
|-------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
|             | 24 h d'hydrolyse                                                       | 48 h d'hydrolyse | 72 h d'hydrolyse |
| Lys         | 2,05                                                                   | 2,03             | 1,98             |
| His         | 1,01                                                                   | 0,98             | 0,86             |
| Arg         | 1,02                                                                   | 0,98             | 0,86             |
| Asp         | 1,01                                                                   | 0,98             | 0,82             |
| Thr         | 0,01                                                                   | 0,01             | 0,00             |
| Ser         | 0,00                                                                   | 0,01             | 0,00             |
| Glu         | 2,03                                                                   | 1,96             | 1,85             |
| Pro         | 0,65                                                                   | 0,56             | 0,47             |
| Gly         | 2,02                                                                   | 1,96             | 1,88             |
| Ala         | 0,01                                                                   | 0,01             | 0,00             |
| Val         | 0,01                                                                   | 0,01             | 0,00             |
| Met         | 1,05                                                                   | 1,02             | 0,96             |
| Ile         | 0,01                                                                   | 0,00             | 0,00             |
| Leu         | 1,01                                                                   | 0,98             | 0,92             |
| Tyr         | 0,01                                                                   | 0,00             | 0,00             |
| Phe         | 1,02                                                                   | 1,01             | 0,96             |

Donnée : une hydrolyse basique montre que le peptide ne contient pas de tryptophane.

2. Déterminer la formule brute du peptide (nombre d'acides aminés de chaque espèce par mole de peptide).

**B - Séquençage par la méthode traditionnelle**

Après action du bromure de cyanogène sur le polypeptide, on retrouve 2 peptides : l'un contient Gly, Glu, Leu et Lys en plus de Met modifiée et l'autre tous les acides aminés restants. Il est rappelé que le bromure de cyanogène coupe du côté carboxylique d'une méthionine, qui donne alors une lactone d'homosérine.

La réaction de Sanger (FDNB) sur le polypeptide, suivie d'hydrolyse totale, conduit à DNP-Gly et DNP-Lys.

Les carboxypeptidases A et B sont sans effet sur le polypeptide.

L'action de la trypsine sur le polypeptide conduit à 4 fragments :

- un térapeptide (1) qui donne avec le FDNB la DNP-Leu et la DNP-Lys. Par ailleurs, (1) est traité avec le bromure de cyanogène, les produits de la réaction sont séparés et parmi eux, il y a un dipeptide qui n'est pas chargé en milieu neutre ;
- un tripeptide (2) qui donne avec le FDNB la DNP-Gly et la DNP-Lys. Un des acides aminés constitutifs n'est pas retenu par une résine échangeuse de cations à pH = 3 ;
- un dipeptide (3) qui donne avec le FDNB le DNP-Asp. Il donne, en plus, une réaction positive avec le réactif de Sakaguchi ;
- un quatrième fragment (4) qui donne avec le FDNB la DNP-Gly. La chymotrypsine hydrolyse ce fragment en 2 dipeptides.

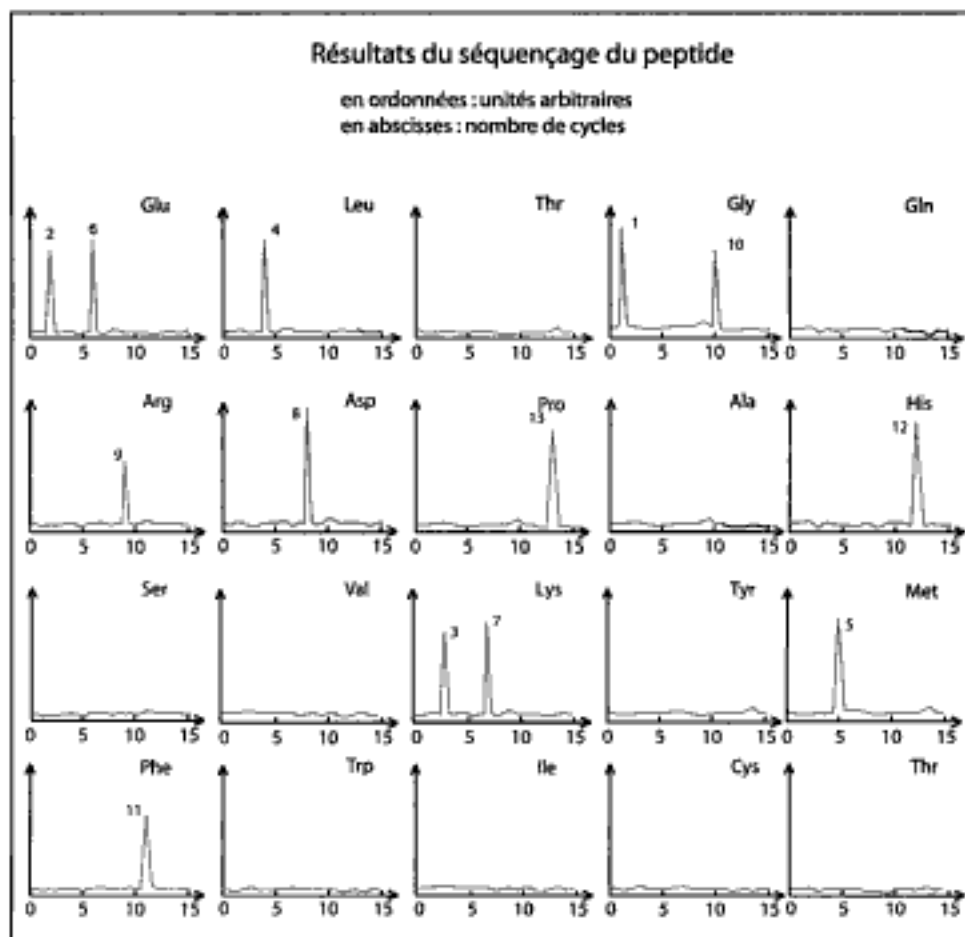
3. Etablir la structure primaire de la séquence polypeptidique.

**C – Séquençage dans un automate utilisant la réaction d'Edman**

- Le peptide est fixé par covalence sur une résine par son extrémité C terminale. Cette résine est ensuite introduite dans le séquenceur. Celui-ci va réaliser de manière cyclique la réaction d'Edman et analyser à l'issue de chaque cycle le dérivé d'acide aminé obtenu.

4. Rappeler le principe de l'utilisation de la réaction d'Edman pour le séquençage de protéines.

15 cycles sont réalisés ici et les produits sont analysés par HPLC. Une série de graphes est réalisée par la machine. Ils indiquent, pour chacun des 20 acides aminés, un signal (en unités arbitraires) proportionnel à la quantité d'acide aminé détecté en fonction du numéro du cycle de séquençage. L'ensemble des résultats figure dans le document ci-dessous.



5. Montrer que la séquence déterminée dans ces conditions correspond bien à celle obtenue précédemment.

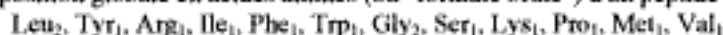
**D – Séquence déterminée à partir de la séquence d'ADN codant pour le peptide**

La séquence de bases codant pour le peptide a été trouvée dans une banque de données.

6. Indiquer comment déterminer à partir de cette séquence la séquence d'acides aminés correspondante.

**Exercice 15 Structure d'un peptide**

La composition globale en acides aminés (ou "formule brute") d'un peptide extrait de *Bacillus brevis* est la suivante :



Après traitement au FDNB ou par l'hydrazine, aucune réaction n'est observée.

Une hydrolyse acide partielle du peptide donne :

- le peptide I qui a pour formule brute :  $\text{Pro}_1, \text{Leu}_2, \text{Met}_1, \text{Arg}_1, \text{Tyr}_1, \text{Val}_1$ . La carboxypeptidase A libère Tyr. A l'issue de cette action, le peptide obtenu est ensuite traité par la carboxypeptidase B ; l'enzyme libère alors Arg ;
- le peptide VI qui a pour formule brute :  $\text{Lys}_1, \text{Trp}_1, \text{Gly}_1$  ;
- le peptide VII qui a pour formule brute :  $\text{Tyr}_1, \text{Ile}_1, \text{Arg}_1$ .

Une hydrolyse chymotrypsique du peptide donne :

- le peptide II qui a pour formule brute :  $\text{Phe}_1, \text{Gly}_1, \text{Ile}_1$  ;
- le peptide III qui a pour formule brute :  $\text{Trp}_1, \text{Gly}_1, \text{Ser}_1, \text{Lys}_1$ .

Une hydrolyse trypsique du peptide donne :

- le peptide IV qui a pour formule brute :  $\text{Pro}_1, \text{Leu}_2, \text{Met}_1, \text{Arg}_1, \text{Trp}_1, \text{Val}_1$ . Le traitement au FDNB permet d'identifier le DNP-Trp ;
- le peptide V qui a pour formule brute :  $\text{Ile}_1, \text{Gly}_2, \text{Ser}_1, \text{Lys}_1, \text{Tyr}_1, \text{Phe}_1$ .

Le traitement du peptide initial par le bromure de cyanogène linéarise le peptide. La chaîne peptidique linéaire est alors traitée par la (leucine) aminopeptidase. Il y a libération successive de Leu, Val, Leu, puis arrêt.

Déterminer la séquence du peptide.

Remarque : l'exercice est délicat à résoudre. Il peut être utile de commencer par comparer les peptides I et IV et d'en tirer les conséquences quant au positionnement respectif de Arg, Tyr et Trp. Considérer ensuite les peptides VI et III, ...

Les modes d'action des différents réactifs utilisés pour élucider la structure primaire du peptide ont été vus précédemment.

## Protéines

### Exercice 16 Masse molaire moléculaire minimale d'une protéine

1 mg d'une holoprotéine contient notamment 22,5  $\mu\text{g}$  de Gly, 23,6  $\mu\text{g}$  de Leu et 24,5  $\mu\text{g}$  de Trp.

Calculer la masse molaire moléculaire minimale de la protéine.

Donnée : les masses molaires moléculaires des acides aminés concernés sont : Gly = 75  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , Leu = 131  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et

Trp = 204  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### Exercice 17 Les familles de protéines sériques

Par électrophorèse, on sépare couramment les protéines sériques en 4 familles : albumine,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -globulines. Le même résultat peut être obtenu par relargage salin à partir de solutions de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  de concentrations judicieusement choisies.

Avec une solution de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  à 15,75 %, on précipite les  $\gamma$ -globulines ; avec une solution à 19,9 %, on précipite les  $\beta$  et  $\gamma$ -globulines et avec une solution à 27,7 %, on précipite la totalité des globulines.

On réalise une série de 4 essais selon les indications figurant dans le tableau ci-dessous :

| Tubes                                                | A     | B     | C     | D     |
|------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Sérum en mL                                          | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   |
| NaCl à 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en mL          | 10    | /     | /     | /     |
| Solution de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ à 15,75 % en mL | /     | 10    | /     | /     |
| Solution de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ à 19,9 % en mL  | /     | /     | 10    | /     |
| Solution de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ à 27,7 % en mL  | /     | /     | /     | 10    |
| Laisser reposer pendant une heure, puis filtrer      |       |       |       |       |
| Filtrat en mL                                        | 2     | 2     | 2     | 2     |
| Réactif du biuret en mL                              | 8     | 8     | 8     | 8     |
| Absorbance à 530 nm par rapport à un témoin réactif  | 0,282 | 0,234 | 0,197 | 0,173 |

Déterminer la concentration en protéines des différentes familles de protéines sériques, ainsi que leur pourcentage par rapport aux protéines totales.

Donnée : le coefficient d'absorption spécifique "a" du milieu de lecture déterminé à partir d'une solution de protéine étalon est de 0,376  $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### Exercice 18 Méthode de Warburg et Christian

Les protéines absorbent dans l'UV à 280 nm, compte tenu de la présence d'acides aminés aromatiques dans leur structure. Cette propriété permet de doser les protéines en solution pure.

Warburg et Christian ont montré que le dosage des protéines restait possible, même en présence d'impuretés nucléiques (cas fréquemment rencontré) qui absorbent également à 280 nm.

Leur méthode consiste, dans ce cas, à mesurer l'absorbance à 260 nm (caractéristique des acides nucléiques) et 280 nm (caractéristique des protéines) et à appliquer la règle d'additivité de la loi de Beer-Lambert.

1. Etablir une relation mathématique permettant de calculer la concentration des protéines en présence d'impuretés nucléiques à partir des absorbances mesurées à 260 et 280 nm.

Données :

- les coefficients d'absorption spécifiques des protéines (obtenus à partir de l'énolase pure) sont :

$$a_{260} = 0,512 \text{ et } a_{280} = 0,895 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

- les coefficients d'absorption spécifiques des acides nucléiques (obtenus à partir de levure) sont :

$$a_{260} = 22,1 \text{ et } a_{280} = 10,8 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}.$$

2. A 10 mL d'un extrait cellulaire, on ajoute 1 mL d' $\text{HClO}_4$  à  $6 \text{ mol.L}^{-1}$ . Le précipité contenant les protéines est redissous dans 100 mL d'une solution tampon adéquate. Dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique, on introduit 2 mL de tampon et 1 mL de la solution protéique. On mesure les absorbances à 260 et 280 nm ; les résultats sont respectivement de 0,452 et 0,610. La solution protéique est-elle pure ? Calculer la concentration en protéines pures de l'extrait cellulaire.

## Interactions protéine ligand

### Exercice 19 Dialyse à l'équilibre

On étudie, par dialyse à l'équilibre, l'interaction d'une protéine P avec un ligand L. Le dispositif de dialyse comprend deux compartiments I et II séparés par une membrane héli-perméable.

La concentration en protéine introduite dans le compartiment I du dispositif à dialyse est de  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Pour différentes concentrations en ligand notées [L], également introduites dans le compartiment I du dispositif, on mesure après réalisation de l'équilibre, la concentration du ligand dans le compartiment I (ligand libre et lié) et dans le compartiment II (ligand libre) ne comprenant pas la protéine.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

|                                                     |                      |                      |                      |                      |                      |
|-----------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| [L] dans le compartiment I ( $\text{mol.L}^{-1}$ )  | $2,89 \cdot 10^{-5}$ | $3,33 \cdot 10^{-5}$ | $3,85 \cdot 10^{-5}$ | $4,50 \cdot 10^{-5}$ | $5,42 \cdot 10^{-5}$ |
| [L] dans le compartiment II ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | $6,43 \cdot 10^{-6}$ | $8,33 \cdot 10^{-6}$ | $1,10 \cdot 10^{-5}$ | $1,50 \cdot 10^{-5}$ | $2,17 \cdot 10^{-5}$ |

A partir de la représentation de Scatchard, déterminer le nombre de sites récepteurs de la protéine pour le ligand, ainsi que la constante d'association et de dissociation du complexe protéine ligand (PL).

N.B : on considère que toute molécule de protéine peut interagir avec le même nombre de molécules de ligand et avec la même affinité.

### Exercice 20 Interaction lactate déshydrogénase (LDH) et nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH)

L'équation de la réaction catalysée par la LDH est la suivante :



Le NADH est fluorescent à 460 nm lorsqu'il est excité par un rayonnement à 340 nm et cette fluorescence est plus élevée en présence de LDH.

On réalise, d'une part, une solution de NADH à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans un tampon de  $\text{pH} = 7,2$ , et, d'autre part, une solution de LDH à une concentration de  $0,473 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le même tampon.

A 2 mL de la solution de LDH, on ajoute des volumes définis de la solution de NADH. Après chaque addition, on mesure la fluorescence "F" en unités arbitraires (UA) à 460 nm. On réalise parallèlement une expérience témoin lorsque les mêmes volumes de NADH sont ajoutés à 2 mL de la solution tampon.

On obtient les résultats suivants :

|                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Numéro de l'expérience                 | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  |
| Volume de NADH ajouté en $\mu\text{L}$ | 0   | 5   | 10  | 15  | 20  | 25  | 30  | 35  | 40  | 50  | 60  | 70  | 80  |
| F avec LDH en UA                       | 0,0 | 1,3 | 2,5 | 3,9 | 5,1 | 6,1 | 6,8 | 7,2 | 7,5 | 8,1 | 8,8 | 9,4 | 10  |
| F sans LDH en UA                       | 0,0 | 0,3 | 0,6 | 0,9 | 1,2 | 1,6 | 1,9 | 2,2 | 2,5 | 3,1 | 3,8 | 4,4 | 5,0 |

#### 1. Détermination du nombre de sites n de la LDH pour NADH

1.1. Tracer sur un même graphique les courbes représentant les variations de F en fonction du volume de NADH ajouté. Interpréter ces courbes.

1.2. Sachant que la masse molaire moléculaire de la LDH est égale à  $150000 \text{ g.mol}^{-1}$  et que la formation du complexe LDH NADH peut être considérée comme pratiquement irréversible, déterminer le nombre de moles de NADH pouvant se fixer sur une mole de LDH ou nombre de sites n de la LDH pour NADH.

Donnée : on négligera le volume de la solution de NADH par rapport à celui de la LDH.

1.3. La LDH étant constituée de 4 sous-unités, que peut-on en conclure ?

#### 2. Exploitation des résultats expérimentaux par la modélisation de Scatchard.

On se propose de déterminer le nombre de sites n de la LDH pour le NADH comme précédemment, mais également de déterminer leur constante de dissociation  $K_D$ . Les sites sont considérés comme indépendants et équivalents.

2.1. Reprendre le tableau de résultats ci-dessus en remplaçant les volumes de la solution de NADH par les concentrations en NADH total correspondantes.

2.2. En sélectionnant judicieusement les résultats expérimentaux, calculer la fluorescence spécifique du NADH libre (a) et celle du NADH lié (b) en UA par mole de NADH.

2.3. Pour les expériences 6 et 7, calculer dans chacun des cas les concentrations en NADH libre notées [NADH libre] et en NADH lié notées [NADH lié].

Donnée : la fluorescence mesurée lors de chaque expérience est égale à : [NADH libre] . a + [NADH lié] . b

2.4. En injectant les concentrations obtenues à la question 2.3 dans l'équation de Scatchard, on obtient un système de deux équations à deux inconnues dont la résolution donne le nombre de sites n ainsi que la constante de dissociation  $K_D$ . Calculer n et  $K_D$ . Comparer la valeur de n avec celle obtenue à la question 1.2.

### Exercice 21 Interaction toxine et récepteur

La toxine T du venin de serpent *Naja naja siamensis* se lie réversiblement au récepteur R de l'acétylcholine de l'organe électrique de l'anguille *Electrophorus electricus* selon l'équation :



On se propose de déterminer le nombre de site(s) récepteur(s) n pour l'acétylcholine par mole de récepteur et la constante de dissociation  $K_D$  du complexe RT.

A cet effet, on réalise une série de 6 expériences utilisant différentes concentrations de toxine marquée au tritium ( $^3T$ ) à raison de  $0,87 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$  en présence de récepteur à une concentration égale à  $1,8 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Le complexe formé lors de chaque expérience est piégé sélectivement par interaction avec un filtre de DEAE-cellulose. La radioactivité présente au niveau du filtre, ainsi que celle du filtrat sont mesurées par comptage. Les résultats expérimentaux sont exprimés en coups par minute ou CPM.

| Numéro de l'expérience                    | 1   | 2   | 3   | 4    | 5    | 6     |
|-------------------------------------------|-----|-----|-----|------|------|-------|
| CPM au niveau du filtre de DEAE-cellulose | 39  | 78  | 116 | 155  | 233  | 310   |
| CPM au niveau du filtrat                  | 223 | 507 | 889 | 1424 | 3527 | 14109 |

1. A l'aide de la représentation de Scatchard, déterminer le nombre de site(s) récepteur(s) n pour l'acétylcholine et la constante de dissociation  $K_D$  du complexe RT.

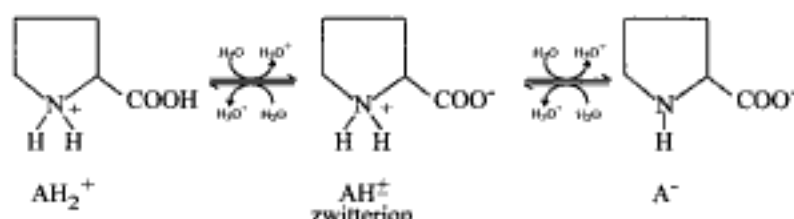
2. La concentration en toxine liée étant notée [toxine liée] et la concentration en toxine libre [toxine libre], représenter la courbe :  $1/[\text{toxine liée}] = f(1 / [\text{toxine totale}])$ . En s'inspirant de la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk utilisée en enzymologie, déterminer à nouveau n et  $K_D$ . L'accord avec les résultats obtenus à la question 1 est-il correct ? Cette représentation est-elle généralisable à toute étude d'interaction protéine ligand ?

\* Donnée :  $1 \text{ Ci} = 2,22 \cdot 10^{12} \text{ CPM}$ . Ci est le symbole de la curie, unité de radioactivité.

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Ionisation de la proline

1. et 2. Equations d'ionisation de la proline et mise en évidence du zwitterion

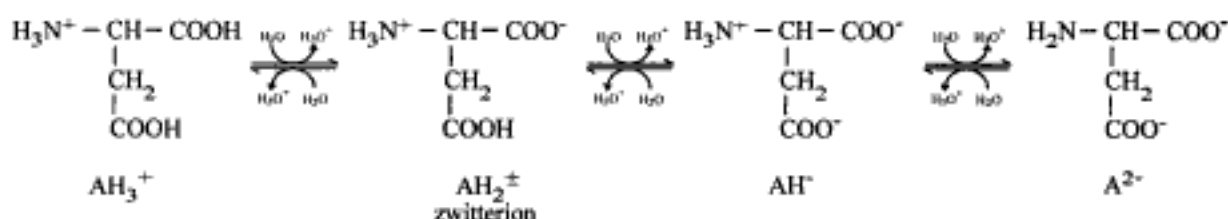


3.  $\text{pH}_i$  de la proline

$$\text{pH}_i = \frac{\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}}{2} \quad \text{soit} \quad \text{pH}_i = \frac{1,99 + 10,6}{2} = 6,30$$

### Exercice 2 Ionisation de l'acide aspartique

1. et 2. Equations d'ionisation de l'acide aspartique et mise en évidence du zwitterion



3.  $\text{pH}_i$  de l'acide aspartique

$$\text{pH}_i = \frac{\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}}{2} \quad \text{soit} \quad \text{pH}_i = \frac{2,09 + 3,86}{2} = 2,98$$

4. Proportions des différentes formes ioniques en présence au  $\text{pH}_i$ .

Au  $\text{pH}_i$ , la forme prédominante est la forme électriquement neutre ( $\text{AH}^\pm$ ).

Le calcul des différentes formes à  $\text{pH} = \text{pH}_i$ , nécessite l'écriture des différentes constantes d'acidité :

$$K_{a1} = \frac{[\text{AH}_2^\pm] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{AH}_3^+]} \quad \text{d'où} \quad \frac{[\text{AH}_2^\pm]}{[\text{AH}_3^+]} = \frac{K_{a1}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{[\text{AH}_2^\pm]}{[\text{AH}_3^+]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}} \quad \text{soit} \quad \frac{[\text{AH}_2^\pm]}{[\text{AH}_3^+]} = 10^{2,98 - 2,09} = 7,76$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{AH}^-] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{AH}_2^\pm]} \quad \text{d'où} \quad \frac{[\text{AH}^-]}{[\text{AH}_2^\pm]} = \frac{K_{a2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{[\text{AH}^-]}{[\text{AH}_2^\pm]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a2}} \quad \text{soit} \quad \frac{[\text{AH}^-]}{[\text{AH}_2^\pm]} = 10^{2,98 - 3,86} = 0,132$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{A}^{2-}] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{AH}^-]} \quad \text{d'où} \quad \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{AH}^-]} = \frac{K_{a2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{AH}^-]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a2}} \quad \text{soit} \quad \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{AH}^-]} = 10^{2,98 - 4,82} = 1,45 \cdot 10^{-7}$$

La loi de conservation de la matière permet d'écrire :

$$[\text{AH}_3^+] + [\text{AH}_2^\pm] + [\text{AH}^-] + [\text{A}^{2-}] = 100 \%$$

Or  $\frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{AH}^-]} = 1,47 \cdot 10^{-7}$ , ce qui veut dire que la proportion de la forme  $\text{A}^{2-}$  peut être considérée comme nulle.

Ainsi,  $[\text{AH}_3^+] + [\text{AH}_2^\pm] + [\text{AH}^-] = 100 \%$

Cette équation peut être réécrite en substituant certains termes par des termes extraits des écritures des constantes d'acidité :

$$[\text{AH}_3^+] = \frac{[\text{AH}_2^\pm]}{7,76} \quad \text{et} \quad [\text{AH}^-] = [\text{AH}_2^\pm] \cdot 0,132$$



On obtient :  $\frac{[AH_2^+]}{7,76} + [AH_2^+] + [AH_2^+] \cdot 0,132 = 100\%$  soit  $[AH_2^+] = \frac{100}{\frac{1}{7,76} + 1 + 0,132} = 79,3\%$

Ce qui permet de calculer la proportion de  $AH_3^{2+} : [AH_3^{2+}] = \frac{[AH_2^+]}{7,76}$  soit  $[AH_3^{2+}] = \frac{79,3}{7,76} = 10,2\%$

et la proportion de  $AH^- : [AH^-] = [AH_2^+] \cdot 0,132$  soit  $[AH^-] = 79,3 \cdot 0,132 = 10,5\%$

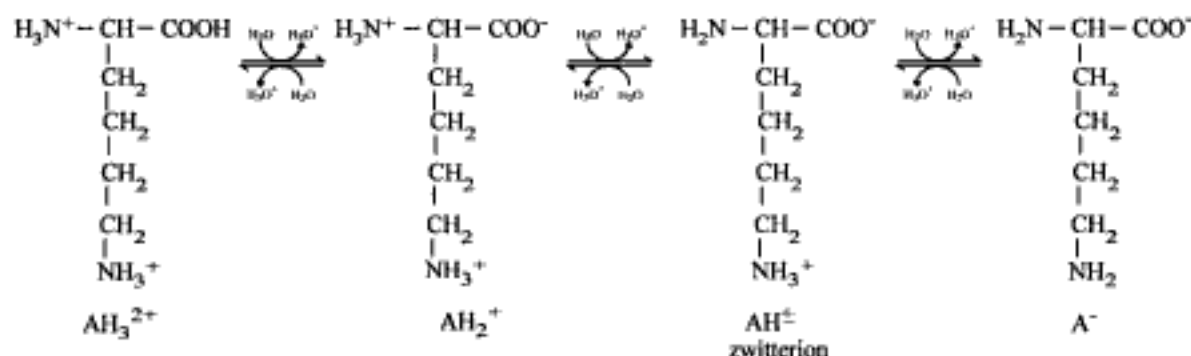
mais aussi de vérifier que la proportion de  $A^{2-}$  est nulle, à ce pH :  $[A^{2-}] = 79,3 \cdot 1,45 \cdot 10^{-7} = 0,00001\%$

Les proportions des différentes formes ioniques en présence, au pH<sub>i</sub>, sont :

- $[AH_3^{2+}] = 10,2\%$
- $[AH_2^+] = 79,3\%$
- $[AH^-] = 10,5\%$
- $[A^{2-}] = 0,00\%$

**Exercice 3** Ionisation de la lysine

1. et 2. Equations d'ionisation de la lysine et mise en évidence du zwitterion



3. pH<sub>i</sub> de la lysine

$$\text{pH}_i = \frac{\text{pK}_{a2} + \text{pK}_{aR}}{2} \quad \text{soit} \quad \text{pH}_i = \frac{8,95 + 10,5}{2} = 9,73$$

4. Proportions des différentes formes ioniques en présence aux pH suivants :

$$\begin{array}{ccccc}
 \text{pH} = \text{pK}_{a1} & \text{pH} = \text{pK}_{a1} + 1 & \text{pH} = \text{pK}_{a1} - 1 & \text{pH} = \text{pK}_{a1} + 2 & \text{pH} = \text{pK}_{a1} - 2 \\
 \text{pH} = \text{pK}_{a2} & \text{pH} = \text{pK}_{a2} + 1 & \text{pH} = \text{pK}_{a2} - 1 & \text{pH} = \text{pK}_{a2} + 2 & \text{pH} = \text{pK}_{a2} - 2 \\
 \text{pH} = \text{pK}_{aR} & \text{pH} = \text{pK}_{aR} + 1 & \text{pH} = \text{pK}_{aR} - 1 & \text{pH} = \text{pK}_{aR} + 2 & \text{pH} = \text{pK}_{aR} - 2 \\
 \text{pH} = \text{pH}_i & \text{pH} = \text{pH}_i + 1 & \text{pH} = \text{pH}_i - 1 & & 
 \end{array}$$

✓ Pour  $\text{pH} = \text{pK}_{aR}$ , soit  $\text{pH} = 2,18$

Le calcul des différentes formes à  $\text{pH} = \text{pK}_{a1}$ , nécessite l'écriture des différentes constantes d'acidité.

$$K_{a1} = \frac{[AH_2^+] \cdot [H_3O^+]}{[AH_3^{2+}]} \quad \text{d'où} \quad \frac{[AH_2^+]}{[AH_3^{2+}]} = \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{[AH_2^+]}{[AH_3^{2+}]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}} \quad \text{soit} \quad \frac{[AH_2^+]}{[AH_3^{2+}]} = 10^{2,18 - 2,18} = 1,00$$

$$K_{a2} = \frac{[AH^\pm] + [H_3O^+]}{[AH_2^+]} \quad \text{d'où} \quad \frac{[AH^\pm]}{[AH_2^+]} = \frac{K_{a2}}{[H_3O^+]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{[AH^\pm]}{[AH_2^+]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a2}} \quad \text{soit} \quad \frac{[AH^\pm]}{[AH_2^+]} = 10^{2,18 - 8,95} = 1,70 \cdot 10^{-7}$$

$$K_{aR} = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[AH^\pm]} \quad \text{d'où} \quad \frac{[A^-]}{[AH^\pm]} = \frac{K_{aR}}{[H_3O^+]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{[A^-]}{[AH^\pm]} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_{aR}} \quad \text{soit} \quad \frac{[A^-]}{[AH^\pm]} = 10^{2,18 - 10,5} = 4,79 \cdot 10^{-9}$$

La loi de conservation de la matière permet d'écrire :

$$[AH_3^{2+}] + [AH_2^+] + [AH^\pm] + [A^-] = 100\%$$

Or  $\frac{[A^-]}{[AH^\pm]} = 4,79 \cdot 10^{-9}$  et  $\frac{[AH^\pm]}{[AH_2^+]} = 1,70 \cdot 10^{-7}$ , ce qui veut dire que les proportions des formes  $A^-$  et  $AH^\pm$  peuvent être considérées comme nulles.

Ainsi,  $[AH_3^{2+}] + [AH_2^+] = 100\%$

Cette équation peut être réécrite en substituant un terme par un terme extrait des écritures des constantes d'acidité :

$$[AH_2^+] = [AH_3^{2+}] \cdot 1,00$$

On obtient :  $[AH_3^{2+}] + [AH_2^+] \cdot 1,00 = 100\%$  soit  $[AH_3^{2+}] = \frac{100}{1+1,00} = 50\%$

Ce qui permet de calculer la proportion de  $AH_2^+$  :  $[AH_2^+] = [AH_3^{2+}] \cdot 1,00$  soit  $[AH_2^+] = 50 \cdot 1,00 = 50\%$

mais aussi de vérifier que la proportion de  $AH^+$  est nulle, à ce pH :  $[AH^+] = 50 \cdot 1,70 \cdot 10^{-7} = 0,000009\%$

et que la proportion de  $A^-$  est nulle, à ce pH :  $[A^-] = 0,000009 \cdot 4,79 \cdot 10^{-9} = 4 \cdot 10^{-14}\%$

Les proportions des différentes formes ioniques en présence à pH = pK<sub>a1</sub> (soit pH = 2,18), sont :

$$- [AH_3^{2+}] = 50,0\%$$

$$- [AH_2^+] = 50,0\%$$

$$- [AH^+] = 0,00\%$$

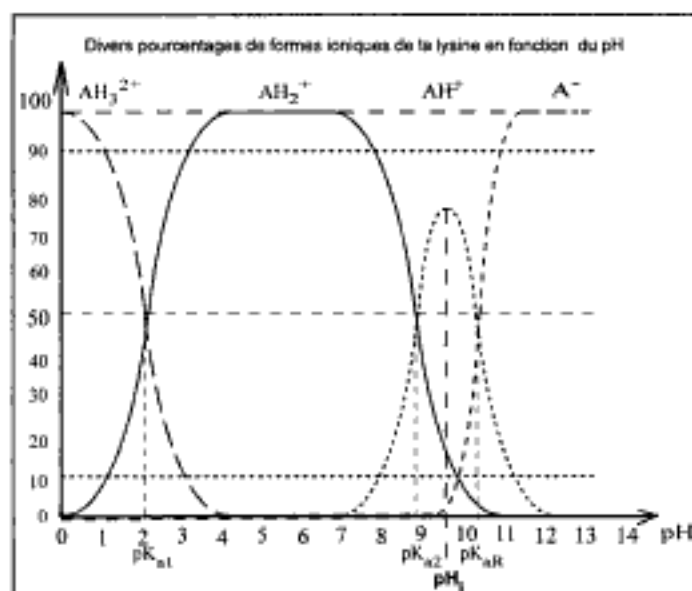
$$- [A^-] = 0,00\%$$

✓ *Pour les autres cas*

Les calculs ne seront pas détaillés mais le raisonnement précédemment utilisé pour pH = pK<sub>a1</sub>, permet de dresser le tableau suivant :

| pH                       | Proportions des formes ioniques présentes |            |          |         |
|--------------------------|-------------------------------------------|------------|----------|---------|
|                          | $[AH_3^{2+}]$                             | $[AH_2^+]$ | $[AH^+]$ | $[A^-]$ |
| pH = pK <sub>a1</sub> -2 | 99,0                                      | 1,00       | 0,00     | 0,00    |
| pH = pK <sub>a1</sub> -1 | 90,9                                      | 9,10       | 0,00     | 0,00    |
| pH = pK <sub>a1</sub>    | 50,0                                      | 50,0       | 0,00     | 0,00    |
| pH = pK <sub>a1</sub> +1 | 9,10                                      | 90,9       | 0,00     | 0,00    |
| pH = pK <sub>a1</sub> +2 | 1,00                                      | 99,0       | 0,00     | 0,00    |
| pH = pK <sub>a2</sub> -2 | 0,00                                      | 99,0       | 1,00     | 0,00    |
| pH = pK <sub>a2</sub> -1 | 0,00                                      | 90,9       | 9,09     | 0,02    |
| pH = pK <sub>a2</sub>    | 0,00                                      | 73,6       | 26,1     | 0,30    |
| pH = pI <sub>1</sub> -1  | 0,00                                      | 62,0       | 37,4     | 0,64    |
| pH = pK <sub>a2</sub>    | 0,00                                      | 49,3       | 49,3     | 1,40    |
| pH = pK <sub>a2</sub> +1 | 0,00                                      | 62,0       | 37,4     | 0,64    |
| pH = pI <sub>1</sub>     | 0,00                                      | 12,4       | 74,9     | 12,7    |
| pH = pK <sub>a2</sub> +2 | 0,00                                      | 7,20       | 72,4     | 20,4    |
| pH = pK <sub>a2</sub>    | 0,00                                      | 1,40       | 49,3     | 49,3    |
| pH = pI <sub>1</sub> +1  | 0,00                                      | 0,70       | 38,2     | 61,1    |
| pH = pK <sub>a2</sub> +2 | 0,00                                      | 0,26       | 26,1     | 73,6    |
| pH = pK <sub>a3</sub> +1 | 0,00                                      | 0,00       | 9,10     | 90,9    |
| pH = pK <sub>a3</sub> +2 | 0,00                                      | 0,00       | 1,00     | 99,0    |

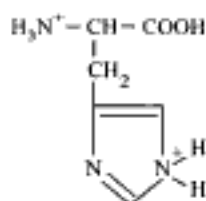
## 5. Courbes de prédominance



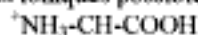
**Exercice 4** Ionisation de l'histidine

1. Formule développée de l'histidine (His) et différentes formes ioniques possibles

- Formule développée :



- Formes ioniques possibles :



|  
imidazole<sup>+</sup>

ou His<sup>2+</sup>



|  
imidazole<sup>+</sup>

His<sup>+</sup>



|  
imidazole<sup>0</sup>

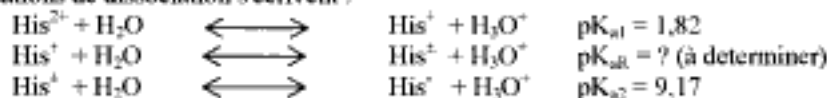
His<sup>z</sup>



|  
imidazole<sup>0</sup>

His<sup>-</sup>

Les équations de dissociation s'écrivent :



2. Calcul du pK<sub>aR</sub>

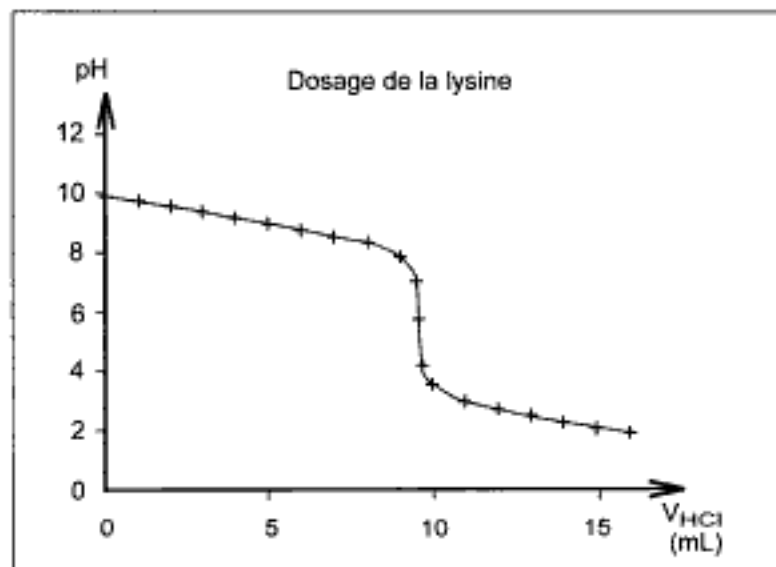
On a pH<sub>i</sub> = (pK<sub>a2</sub> + pK<sub>a3</sub>) / 2, d'où pK<sub>a2</sub> = 2 · pH<sub>i</sub> - pK<sub>a3</sub> ≈ 6

3. Pouvoir tampon

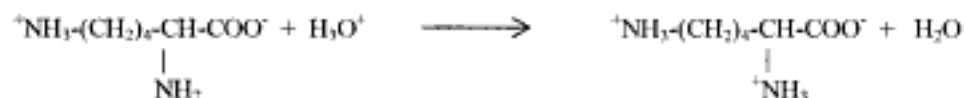
A pH = 6, on se trouve au point où la moitié des groupements imidazole sont dissociés ; le pouvoir tampon est alors maximal (voir la notion de tampon dans le chapitre "Notions préliminaires").

**Exercice 5** Dosage pH-métrique de la lysine

1. Tracé de la courbe pH = f(V<sub>HCl</sub>) :



2. La solution à doser contenant de la lysine sous forme isoélectrique (le pH de départ est le pH<sub>i</sub>), l'équation de la réaction de dosage est la suivante :



3. Le volume équivalent déterminé par la méthode des tangentes est V<sub>eq</sub> = 9,60 mL.

A l'équivalence, le nombre n de moles d'ions hydronium cédés par l'acide chlorhydrique est égal au nombre n<sub>1</sub> de moles d'ions hydronium acceptés par la base, l'histidine sous forme isoélectrique.

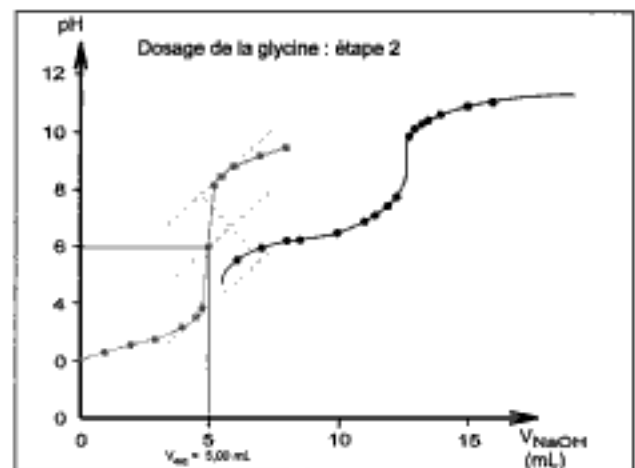
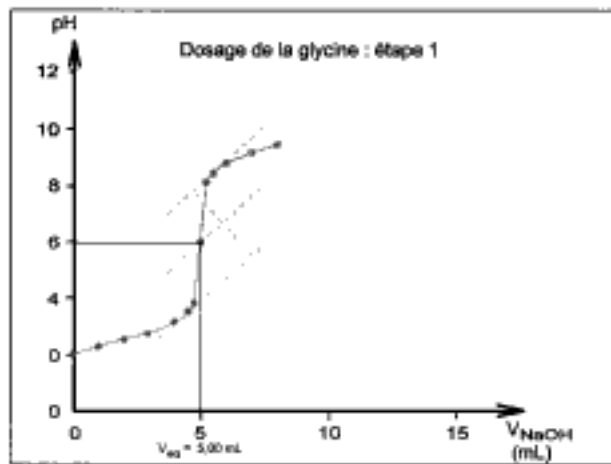
$$n = n_1 \Leftrightarrow C_1 \cdot V_{\text{eq},1} = C_2 \cdot V_2 \cdot 1 \text{ et } C_2 = C_1 \cdot V_{\text{eq},1} / V_2 \text{ d'où } C_2 = 0,100 \cdot 9,60 / 20 = 0,0480 \text{ mol.L}^{-1}.$$

#### 4. Détermination et calcul des pK :

- à la demi-équivalence, c'est-à-dire pour un volume de HCl versé de  $9,60 / 2 = 4,80$  mL, on a le  $\text{pK}_{\text{a}2}$  de la lysine sur l'axe des pH, soit  $\text{pK}_{\text{a}2} = 8,95$  ;
- à l'équivalence, on a un  $\text{pH} = 5,57$ . Or ce pH est relié à  $\text{pK}_{\text{a}1}$  et à  $\text{pK}_{\text{a}2}$  par la relation  $\text{pH} = (\text{pK}_{\text{a}1} + \text{pK}_{\text{a}2}) / 2$ . Connaissant le  $\text{pK}_{\text{a}2}$ , on en déduit  $\text{pK}_{\text{a}1} = 2,19$  ;
- le pH de départ est de 9,74, c'est le  $\text{pH}_i$  de la lysine, on a  $\text{pH}_i = (\text{pK}_{\text{a}2} + \text{pK}_{\text{a}R}) / 2$ . Le calcul donne  $\text{pK}_{\text{a}R} = 10,53$  ;
- tous ces  $\text{pK}_a$  sont en accord avec les valeurs attendues (voir résumé du cours).

### Exercice 6 Dosage pH-métrique de la glycine

#### 1. Courbe $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$ :



Il s'agit d'une courbe de pH classique et la méthode des tangentes donne  $V_{\text{eq}} = 5,00$  mL.

#### 2. Commentaires sur l'étape 1

La partie de la glycine sous forme de  $\text{glycine}^+$  cède ses ions hydronium à la base NaOH. A l'équivalence, on a alors 100 % de la glycine sous forme  $\text{glycine}^{\pm}$ , c'est-à-dire sous forme isoélectrique. Le pH correspondant au volume équivalent  $V_{\text{eq}}$  est de 5,97, c'est-à-dire le  $\text{pH}_i$  de la glycine, ce qui confirme que la glycine est à 100 % sous forme isoélectrique.

L'étape 1 précise la procédure à suivre pour avoir 100 % de la glycine sous forme isoélectrique dans la solution, afin de procéder ensuite au dosage pH-métrique de la glycine proprement dit.

#### 3. Courbe $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$ en présence de formaldéhyde (voir ci-dessus).

Le nouveau volume équivalent  $V'_{\text{eq}}$  déterminé par la méthode des tangentes donne  $V'_{\text{eq}} = 12,50$  mL.

#### 4. Exploitation des résultats de l'étape 2

Au cours de cette étape, la glycine sous forme isoélectrique cède ses ions hydronium à la base NaOH.

A l'équivalence (la glycine est alors à 100% sous forme  $\text{glycine}^{\pm}$ ), le nombre de moles  $n_1$  d'ions hydronium cédés par la glycine est égal au nombre  $n$  de moles d'ions hydronium acceptés par la base NaOH.

$$n_1 = n \Leftrightarrow C_1 \cdot V_1 \cdot 1 = C_2 \cdot V \cdot 1 \quad \text{et} \quad C_2 = C_1 \cdot V / V_1$$

Or, le volume  $V$  nécessaire à la neutralisation complète de la glycine sous forme isoélectrique est  $V = V'_{\text{eq}} - V_{\text{eq}}$  (à déduire des représentations graphiques effectuées aux questions 1 et 3), d'où  $V = 12,5 - 5 = 7,5$  mL.

$$C_1 = 0,140 \cdot 7,5 / 10,00 = 0,105 \text{ mol.L}^{-1}$$

#### Remarque :

L'examen des courbes pH-métriques laisse à penser que sans la présence de formaldéhyde, le saut de pH lors de la neutralisation de la glycine sous forme isoélectrique, serait peu ou pas visible, d'où l'intérêt de cette technique dite de formoltitration. Le formaldéhyde se fixe en effet sur la fonction amine de la glycine $^{\pm}$  en milieu neutre pour donner un dérivé dihydroxyméthylé (dérivé du diméthylol), ce qui a pour effet de diminuer le  $\text{pK}_{\text{a}2}$  de la glycine et de rendre la titrimétrie ou la pH-métrie possible.

Le volume de NaOH qui serait nécessaire pour faire passer la glycine à 100 % sous forme  $\text{glycine}^{\pm}$  en  $\text{glycine}^{\pm}$  est de 7,50 mL (il s'agit du même volume de NaOH que celui qui est nécessaire pour faire passer 100% de la  $\text{glycine}^{\pm}$  en  $\text{glycine}^{\pm}$ ).

$V_{\text{eq}}$  (question 1) étant de 5,00 mL, on en déduit que la proportion de  $\text{glycine}^{\pm}$  dans le mélange est de  $5,00 / 7,50 = 2/3$  et celui de la  $\text{glycine}^{\pm}$  de  $1/3$ . Le rapport  $[\text{glycine}^{\pm}] / [\text{glycine}^{\pm}]$  est donc égal à 2.

Le même résultat peut être obtenu à partir de l'équation de Henderson-Hasselbalch, appliquée au premier résultat expérimental pour  $V_{\text{NaOH}} = 0,00 \text{ mL}$ , soit  $\text{pH} = \text{pK}_{\text{a1}} + \log ([\text{gly}^-]/[\text{gly}^0])$ , avec  $\text{pH} = 2,04$  et  $\text{pK}_{\text{a1}} = 2,34$ .

### Exercice 7 Pouvoir rotatoire de la L-alanine

On applique la loi de Biot, qui relie la concentration de la L-alanine [Ala] au pouvoir rotatoire  $\alpha$ .

$$\alpha = [\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} \cdot l \cdot [\text{Ala}] \text{ avec } [\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} \text{ exprimé en } ^\circ \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}, l \text{ en dm et } [\text{Ala}] \text{ en g} \cdot \text{mL}^{-1}.$$

$$[\text{Ala}] = 0,36 / (1,8 \cdot 1) = 0,200 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ ou } 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, \text{ soit } 200 / 89 = 2,25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}.$$

### Exercice 8 Etude d'un mélange d'acides aminés

Trp est le seul acide aminé qui absorbe à 280 nm, étant donné son caractère aromatique. Sa concentration [Trp] est donnée par l'application de la loi de Beer-Lambert.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot [\text{Trp}], \quad \text{d'où } [\text{Trp}] = A / (\varepsilon \cdot l) = 0,56 / (5600 \cdot 1) = 1,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

et, compte tenu de la dilution de la solution initiale au 1/1000,  $[\text{Trp}] = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Le pouvoir rotatoire est exercé par Ile et Trp, Gly ne possédant pas de carbone asymétrique. On applique donc la loi de Biot,

$$\alpha = [\alpha_{\text{Ile}}]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} \cdot l \cdot [\text{Ile}] + [\alpha_{\text{Trp}}]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} \cdot l \cdot [\text{Trp}]$$

De ceci on tire :

$$[\text{Trp}] = 0,100 \cdot 204 \cdot 10^{-3} = 2,04 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}.$$

L'application numérique avec les unités habituelles donne :

$$-1,05 = +12,4 \cdot 2 \cdot [\text{Ile}] - 33,7 \cdot 2 \cdot 2,04 \cdot 10^{-2}, \\ \text{d'où } [\text{Ile}] = 1,31 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} = 13,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} = 13,1 / 131 = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}.$$

Le nombre de moles d'ions hydronium  $n$  acceptés par la base NaOH est égal au nombre de moles d'ions hydronium cédés par les acides aminés ;  $n = C_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} = 0,100 \cdot 30 \cdot 10^{-3} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$ .

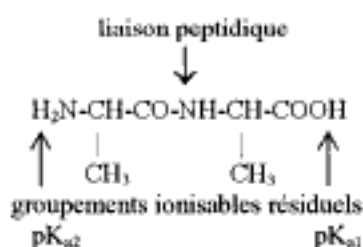
Les acides aminés présents dans les 10 mL de solution à étudier libèrent donc :

$$3,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol d'ions hydronium, soit } 3 \cdot 10^{-3} / 10 \cdot 10^{-3} = 0,300 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}.$$

Trp et Ile ayant chacun une concentration de  $0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  et libérant, dans les conditions envisagées, chacun une mole d'ions hydronium par mole d'acide aminé (tout comme Gly d'ailleurs),  $[\text{Gly}] = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### Exercice 9 Alanine et dérivés peptidiques

1. Les deux groupements ionisables de l'alanine sont le groupement  $\alpha$ -aminé et le groupement  $\alpha$ -carboxylique.
2. Formule développée, mise en évidence de la liaison peptidique et des groupements ionisables du peptide



3. Le calcul du pH<sub>i</sub> s'effectue dans chacun des cas à partir de la formule  $\text{pH}_i = (\text{pK}_{\text{a1}} + \text{pK}_{\text{a2}}) / 2$ . Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

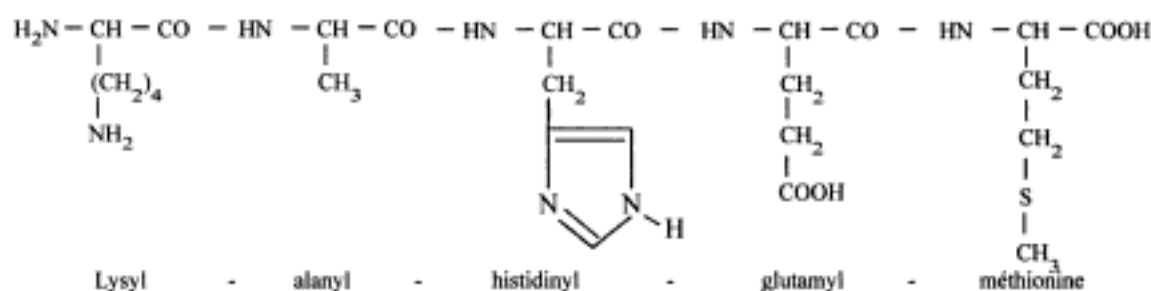
| Acide aminé ou peptides                     | pK <sub>a1</sub> | pK <sub>a2</sub> | pH <sub>i</sub> |
|---------------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Ala                                         | 2,34             | 9,69             | 6,02            |
| ${}_2\text{HN-Ala-Ala-COOH}$                | 3,12             | 8,80             | 5,96            |
| ${}_2\text{HN-Ala-Ala-Ala-COOH}$            | 3,39             | 8,03             | 5,71            |
| ${}_2\text{HN-Ala-(Ala)}_n\text{-Ala-COOH}$ | 3,42             | 7,94             | 5,68            |

Au fur et à mesure que la taille du peptide augmente, le caractère acide de la fonction  $-\text{COOH}$  diminue et celui de la fonction  $-\text{NH}_3^+$  augmente, le peptide ayant globalement un caractère légèrement plus acide. Ceci est la résultante des effets électroniques moléculaires sur les groupements ionisables résiduels.

Cependant, d'une manière générale dans les peptides, les pK<sub>a</sub> des groupements ionisables résiduels sont assez peu modifiés par rapport à leur valeur dans l'acide aminé libre.

#### Exercice 10 Peptides. Variation de la charge en fonction du pH

- La formule développée du peptide Lys - Ala - His - Glu - Met est la suivante :



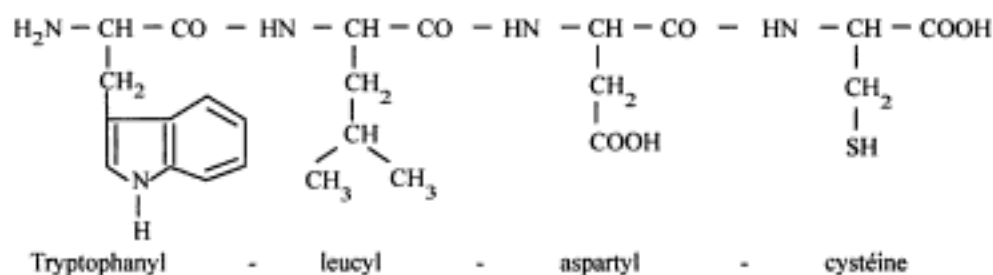
Pour chaque peptide, on détermine la charge nette à différents pH : au pH initial (forme cationique maximale), aux pH représentant les pK<sub>a</sub> de chaque fonction ionisable et aux points d'équivalence notés Eq. suivi d'un numéro (fonction entièrement dissociée ou non dissociée). Le pH<sub>i</sub> se détermine alors très facilement.

Charge nette en fonction du pH :

| Groupement ionisable (pK <sub>a</sub> ) | pH        |             |           |             |           |             |          |             |           |             |           |
|-----------------------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|                                         | initial   | 3,00        | Eq. 1     | 4,50        | Eq. 2     | 6,50        | Eq. 3    | 8,50        | Eq. 4     | 10,30       | Eq. 5     |
| $\alpha\text{-COOH}$ (3,0)              | 0         | -0,5        | -1        | -1          | -1        | -1          | -1       | -1          | -1        | -1          | -1        |
| $\gamma\text{-COOH}$ (4,5)              | 0         | 0           | 0         | -0,5        | -1        | -1          | -1       | -1          | -1        | -1          | -1        |
| Imidazole (6,5)                         | +1        | +1          | +1        | +1          | +1        | +0,5        | 0        | 0           | 0         | 0           | 0         |
| $\alpha\text{-NH}_2$ (8,5)              | +1        | +1          | +1        | +1          | +1        | +1          | +1       | +0,5        | 0         | 0           | 0         |
| $\varepsilon\text{-NH}_2$ (10,5)        | +1        | +1          | +1        | +1          | +1        | +1          | +1       | +1          | +1        | +0,5        | 0         |
| <b>Charge nette</b>                     | <b>+3</b> | <b>+2,5</b> | <b>+2</b> | <b>+1,5</b> | <b>+1</b> | <b>+0,5</b> | <b>0</b> | <b>-0,5</b> | <b>-1</b> | <b>-1,5</b> | <b>-2</b> |

$$\text{pH}_i = (6,5 + 8,5) / 2 = 7,5$$

- La formule développée du peptide 2 est la suivante :



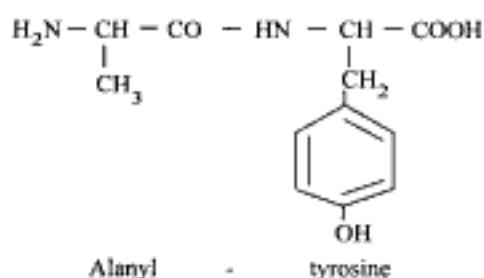
Charge nette en fonction du pH :

| Groupe<br>ionisable (pK <sub>a</sub> ) | pH        |             |          |             |           |             |           |             |           |    |
|----------------------------------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|----|
|                                        | Initial   | 3,00        | Eq. 1    | 4,50        | Eq. 2     | 8,50        | Eq. 3     | 10,00       | Eq. 4     |    |
| α-COOH (3,0)                           | 0         | -0,5        | -1       | -1          | -1        | -1          | -1        | -1          | -1        | -1 |
| β-COOH (4,5)                           | 0         | 0           | 0        | -0,5        | -1        | -1          | -1        | -1          | -1        | -1 |
| α-NH <sub>2</sub> (8,5)                | +1        | +1          | +1       | +1          | +1        | +0,5        | 0         | 0           | 0         | 0  |
| -SH (10,0)                             | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 0         | 0           | -0,5      | -1 |
| <b>Charge nette</b>                    | <b>+1</b> | <b>+0,5</b> | <b>0</b> | <b>-0,5</b> | <b>-1</b> | <b>-1,5</b> | <b>-2</b> | <b>-2,5</b> | <b>-3</b> |    |

pH<sub>i</sub> = (3,0 + 4,5) / 2 = 3,75

**Exercice 11** Etude d'un peptide. Variation de la charge en fonction du pH

1. La formule développée de l'alanyl-tyrosine est la suivante :



2. Les différentes formes ioniques du peptide figurent dans le tableau suivant :

| pH        | très acide     | 2,20                               | 5,95           | 9,70                               | 9,90           | 10,10                               | très alcalin    |
|-----------|----------------|------------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------|
| Peptide P | P <sup>+</sup> | ½P <sup>+</sup> et ½P <sup>z</sup> | P <sup>z</sup> | ½P <sup>z</sup> et ½P <sup>-</sup> | P <sup>-</sup> | ½P <sup>-</sup> et ½P <sup>z-</sup> | P <sup>z-</sup> |

Remarque : les valeurs 2,20 - 9,70 et 10,10 correspondent aux pK<sub>a</sub> des groupements ionisables du peptide et les valeurs 5,95 et 9,90 correspondent à la demi-somme des pK<sub>a</sub> voisins.

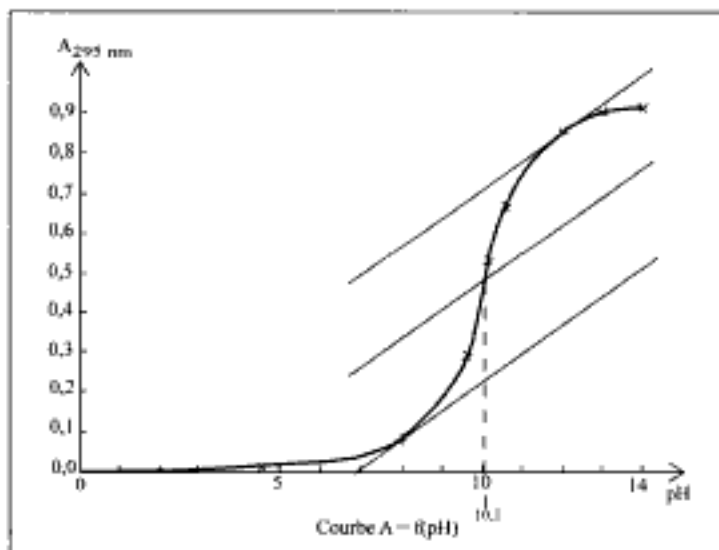
3. Tracé de la courbe A = f (pH)

L'augmentation de l'absorbance en fonction du pH traduit le passage du noyau phénolique du résidu tyrosyl de la forme φ-OH à la forme φ-O<sup>-</sup>. Cela se traduit par une augmentation de l'absorbance du fait d'une plus grande délocalisation électronique au niveau du cycle aromatique.

La courbe ressemble à une courbe de type pH-métrique et à l'équivalence, déterminée par la méthode des tangentes, il y a 50 % de la forme φ-OH et 50 % de la forme φ-O<sup>-</sup>. Le pH correspondant est donc le pK<sub>a</sub> de la chaîne latérale de la tyrosine, soit 10,1.

Le coefficient d'absorption molaire se calcule à partir de la loi de Beer-Lambert :

$c = A / (l \cdot [\text{peptide}])$  soit  $\epsilon = 0,912 / (1 \cdot 0,4 \cdot 10^{-3}) = 2280 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .



**Exercice 12** Séquence d'un térapeptide

1 et 2. Consulter le résumé du cours.

3. Séquence du térapeptide :

- l'acide aminé N-terminal est la cystéine, acide aminé formant des ponts disulfure intra - ou interchaînes dans les peptides et les protéines ;
- l'acide aminé suivant est fortement chargé négativement à pH = 8,5. Il s'agit d'un acide aminé acide, dont le seul représentant présent ici est Glu ;
- le peptide ayant été obtenu après hydrolyse trypsique, l'acide aminé C-terminal est forcément Arg ;
- Tyr est donc en position 3.

La séquence est : H<sub>2</sub>N-Cys-Glu-Tyr-Arg-COOH

**Exercice 13** Analyse d'un peptide

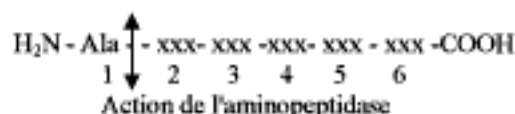
1. La nature peptidique du composé peut être mise en évidence par utilisation du réactif du biuret.

2. Le réactif utilisé pour localiser les acides aminés sur le chromatogramme peut être la ninhydrine (par exemple une solution de ninhydrine à 0,25 % (m/v) dans l'acétone).

Il est possible de révéler spécifiquement l'arginine par pulvérisation du réactif de Sakaguchi ( $\alpha$ -naphтол, hypobromite de sodium) sur le chromatogramme.

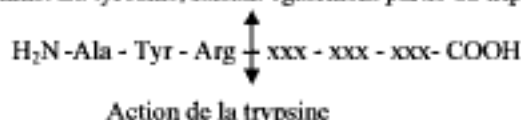
3. Après hydrolyse totale du peptide, on identifie et on quantifie les différents acides aminés constitutifs du peptide par chromatographie de partage en phases inverses. La masse molaire moléculaire du peptide peut alors être établie par le calcul.

4. La méthode à l'aminopeptidase permet d'identifier l'acide aminé N-terminal ; il s'agit de l'alanine, qui occupe donc la position 1 de l'hexapeptide.

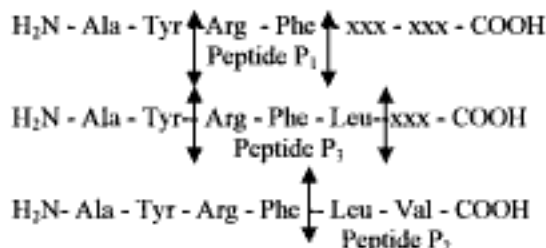


xxx symbolise un acide aminé, dont l'identification pour une position donnée n'est pas encore établie.

L'hexapeptide est scindé en deux tripeptides par action de la trypsine. Cette dernière coupe la liaison peptidique impliquant le groupement carboxyl d'une arginine ou d'une lysine. L'arginine occupe donc la position 3, puisqu'elle fait partie du tripeptide contenant également l'alanine. La tyrosine, faisant également partie du tripeptide se situe alors en position 2.



Le reste de la structure s'obtient par recoupement à partir des peptides obtenus par l'hydrolyse acide partielle.



La séquence en acides aminés du peptide est : H<sub>2</sub>N-Ala-Tyr-Arg-Phe-Leu-Val-COOH

**Exercice 14** Structure primaire d'une séquence polypeptidique**A – Hydrolyse acide et détermination de la formule brute des peptides**

1. Le dosage des acides aminés est actuellement réalisé par des appareils de chromatographie liquide haute performance : la technique utilisée est celle des phases inverses ("reverse" en anglais) (CLHP PR ou HPLC RP).

Les acides aminés sont transformés par le réactif d'Edman en dérivés phénylthiohydantoïnes (PTH-acides aminés – voir résumé de cours) plus hydrophobes et possédant des propriétés spectrales (absorption à 254 nm).



Lors de la charge de la colonne de chromatographie, ces dérivés d'acides aminés se fixent sur la partie hydrophobe d'une phase stationnaire (par exemple, silice greffée en  $C_{18}$ ) ; ceux-ci seront alors déplacés sélectivement par une phase mobile plus polaire.

La présence dans l'éluat des divers dérivés d'acides aminés est mise en évidence par l'augmentation d'absorbance à 254 nm.

Remarque : une autre méthode chromatographique peut également être utilisée : la chromatographie en phase gazeuse.

A titre historique, il faut également citer la chromatographie par échange d'ions.

2. Dans le tableau présenté, les valeurs des rapports de quantités d'acide aminé à la quantité de peptide hydrolysé se répartissent en plusieurs groupes :

- groupe 1 : valeurs quasiment nulles pour les trois temps d'hydrolyse : ces acides aminés sont absents du peptide ; c'est le cas de Thr, Ser, Ala, Val, Ile, Tyr ;
- groupe 2 : valeurs proches d'un nombre entier (1 ou 2) ; valeurs décroissantes en fonction du temps d'hydrolyse du fait de la dégradation des molécules ; on peut en conclure que les acides aminés sont présents et que leur nombre par mole de peptide est égal au rapport déterminé ;
- groupe 3 : valeurs non nulles mais ne correspondant pas à un nombre entier ; c'est le cas de Pro ; avec des valeurs proches de 0,5, on peut penser qu'une seule molécule est présente.

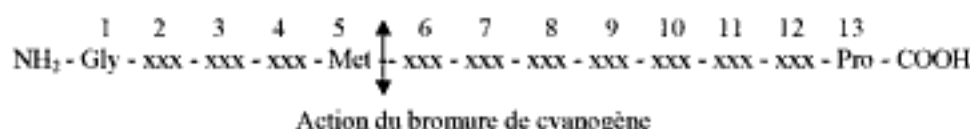
La formule brute du peptide est donc :



### B - Séquençage par la méthode traditionnelle

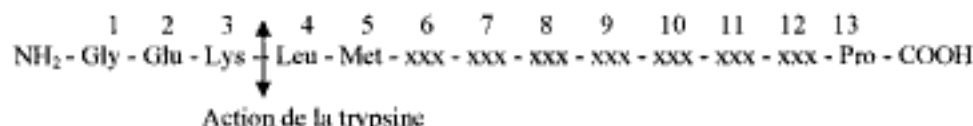
3. La séquence peptidique comporte 13 acides aminés dont le premier est Gly ou Lys (réaction de Sanger) et le dernier Pro (absence de réaction avec les carboxypeptidases A et B). La réaction de Sanger fonctionne également avec l' $\epsilon$ - $\text{NH}_2$  de Lys, mais si Lys était le premier acide aminé de la séquence polypeptidique, à la suite de l'action de la trypsine sur le polypeptide, il y aurait formation de lysine libre, ce qui est incompatible avec les données de l'énoncé. Le premier acide aminé de la séquence est donc Gly.

Compte tenu des résultats de l'action du bromure de cyanogène, il est possible de positionner la méthionine en position 5. On a, pour l'instant :

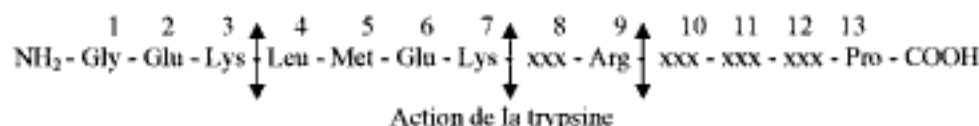


Il convient maintenant d'exploiter les résultats obtenus suite à l'hydrolyse par la trypsine. Seuls les composés (2) et (4) commencent par Gly. Gly en position 1 du polypeptide fait donc partie du tripeptide (2) ou du térapeptide (4). Lys est donc en position 3 ou 4, Arg ne pouvant être concerné, car faisant partie du dipeptide (3).

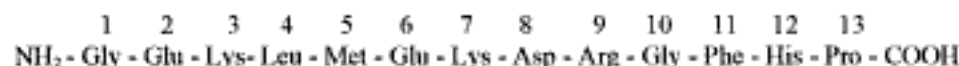
Une option doit être correcte et l'autre pas. Si l'on place, par exemple, Lys en 3<sup>(\*)</sup>, l'acide aminé en 2 ayant un caractère acide, puisque non chargé à pH = 3 est Glu et, compte tenu des résultats de l'action du bromure de cyanogène sur le polypeptide à étudier, l'acide aminé en position 4 est Leu. On a alors :



Pour ce qui concerne le térapeptide (1), Leu est en position 1, Lys en position 4 (coupure par la trypsine). En position 3, on doit avoir Glu (Asp fait partie du dipeptide (3)) pour pouvoir expliquer les résultats de l'action du bromure de cyanogène sur (1), c'est-à-dire la formation d'un dipeptide non chargé en milieu neutre. On a, compte tenu du fait que l'acide aminé en position 9 sur le polypeptide est maintenant obligatoirement Arg, pour pouvoir expliquer la formation du dipeptide (3) et du térapeptide (4) suite à l'action de la trypsine sur la séquence peptidique, ainsi que la réaction positive au réactif de Sakaguchi :



Asp faisant partie du dipeptide (3) est en position 8 ; Phe est en position 11 pour expliquer l'action de la chymotrypsine ; Gly est en position 10 (réaction de Sanger) et finalement His, seul acide aminé restant, est en position 12. La séquence complète est donc la suivante :



(\*) Le lecteur pourra vérifier que l'option de placer Lys en 4 ne fonctionne pas.

### C – Séquençage dans un automate utilisant la réaction d'Edman

4. Le réactif d'Edman (phénylthiocyanate - PTC) se fixe en milieu acide sur la fonction aminée terminale avec formation de phénylthiocarbamyl aminoacide. Ce composé, en milieu basique, se cyclise en phénylthiohydantoïne - acide aminé (PTH-aa ; voir résumé de cours) avec détachement de l'acide aminé.

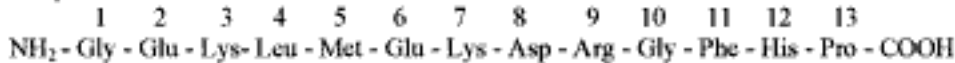
Cet acide aminé est alors identifié par CLHP PR. Le réactif d'Edman peut alors réagir sur le nouvel acide aminé N-terminal de la chaîne amputée d'un acide aminé.

Est ainsi réalisé un cycle qui permet l'identification de l'acide aminé N-terminal.

5. Le premier cycle réalisé permet de mettre en évidence l'acide aminé N-terminal, à savoir l'acide aminé de rang 1. Le second cycle donnera le nom du second acide aminé et ainsi de suite.

Il suffit de relever le nom des acides aminés dans l'ordre croissant des cycles pour obtenir la séquence des acides aminés.

Ainsi obtient on la séquence suivante :



qui correspond à celle précédemment déterminée.

Remarque : la taille du peptide considéré est relativement modeste : 13 acides aminés. Les automates de séquençage sont en général utilisés pour des peptides de plus grande taille.

### D – Séquence déterminée à partir de la séquence de bases de l'ADN codant pour la protéine

6. A partir de cette séquence de base vont être recherchées les séquences correspondant aux codons d'initiation et de terminaison de la traduction.

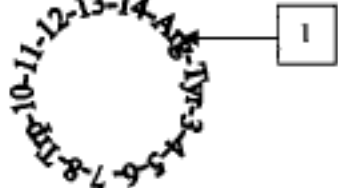



A l'aide de la version du code génétique correspondant à l'organisme (et à l'organite) d'origine de la protéine, il sera possible de faire correspondre à chaque triplet de bases un acide aminé.

#### Exercice 15 Structure d'un peptide

L'examen de la composition en acides aminés montre qu'il s'agit d'un peptide constitué de 14 acides aminés.

L'hydrazine et le DNFB étant sans action sur le peptide, il s'agit d'un peptide cyclique.

Remarque préliminaire : dans les schémas suivants, les acides aminés sont représentés par leur symbole, par xxx ou encore par un numéro dans la structure cyclique.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>La comparaison des peptides I et IV donne :</p> <p>I - <math>\text{H}_2\text{N}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{COOH}</math></p> <p>IV - <math>\text{H}_2\text{N}-\text{Trp}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{xxx}-\text{Arg}-\text{COOH}</math></p> <p style="text-align: center;">← mêmes acides aminés →</p> <p>Si l'on attribue arbitrairement la position 1 à Arg et en sélectionnant le sens des aiguilles d'une montre pour les numéros croissants, on a Tyr en 2, Trp en 9 et donc à ce stade le schéma ci-contre :</p> |  |
| <p>Le traitement du peptide par la trypsine donne les peptides IV et V, qui sont tous deux des heptapeptides. Arg étant en position 1, l'autre acide aminé basique, soit Lys, est forcément en position 8.</p> <p>Cela donne le schéma provisoire ci-contre :</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |
| <p>La composition du peptide III permet de situer Gly et Ser en position 6 ou 7, sans qu'il soit possible de trancher pour l'instant.</p> <p>La composition du peptide VI, soit Lys, Trp, Gly permet de placer Gly en position 7 et donc Ser en position 6. On obtient le schéma provisoire ci-contre :</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
| <p>Le peptide II, Phe, Gly, Ile, obtenu par action de la chymotrypsine permet de situer Phe en position 5 et Gly et Ile en position 3 ou 4, sans qu'il soit possible de trancher pour l'instant.</p> <p>La composition du peptide VII, Tyr, Ile, Arg permet de situer Ile en position 3 et donc Gly en position 4.</p> <p>Ce qui donne le schéma provisoire ci-contre :</p>                                                                                                                                                                                                                            |  |

Le traitement au bromure de cyanogène, agissant du côté carboxylique de Met et s'arrêtant après Pro, permet de préciser la séquence suivante : Met-Leu-Val-Leu-Pro et donc la structure complète du peptide :



### Exercice 16 Masse molaire moléculaire minimale d'une protéine

Il est possible de calculer le nombre  $n$  de  $\mu\text{moles}$  de chacun des acides aminés envisagés dans l'énoncé dans 1 mg d'holoprotéine :

$n = m / M$ , soit  $n_{\text{Gly}} = 22,5 / 75 = 0,30 \mu\text{mol}$ ,  $n_{\text{Leu}} = 23,6 / 131 = 0,18 \mu\text{mol}$  et  $n_{\text{Trp}} = 24,5 / 204 = 0,12 \mu\text{mol}$ .

On en déduit que,  $n_{\text{Gly}} / n_{\text{Trp}} = 0,30 / 0,12 = 2,5$  et  $n_{\text{Leu}} / n_{\text{Trp}} = 0,18 / 0,12 = 1,5$ .

Or, il y a au moins une mole de Trp par mole de protéine, donc dans le cas de la présence d'une mole de Trp par mole de protéine, il y aurait 2,5 moles de Gly et 1,5 mole de Leu par mole de protéine. Cela n'est évidemment pas possible, le nombre de moles pour chaque acide aminé devant être un nombre entier.

Sans qu'il soit besoin d'un raisonnement mathématique, on s'oriente facilement vers la solution ; il y a au moins 2 Trp, donc  $2 \cdot 2,5 = 5$  Gly et  $2 \cdot 1,5 = 3$  Leu.

Si l'on se réfère par exemple à Trp, 1 mg de protéine correspond à  $0,12 / 2 = 0,06 \mu\text{mol}$  de protéine, d'où la masse molaire moléculaire minimale de la protéine est alors :

$$M = m / n \quad \text{soit} \quad M = 1 \cdot 10^{-3} / 0,06 \cdot 10^{-6} = 16670 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

### Exercice 17 Les familles de protéines sériques

Dans un premier temps, il est utile de préciser quelles sont les fractions dosées dans les différents filtrats correspondant aux tubes A, B, C et D :

- tube A : aucune fraction n'étant précipitée, il est alors possible de calculer la concentration en protéines totales ;
- tube B : il y a précipitation des  $\gamma$ -globulines, un calcul permet de déterminer la concentration de l'ensemble albumine +  $\alpha$ - et  $\beta$ -globulines ;
- tube C : il y a précipitation des  $\beta$ - et  $\gamma$ -globulines, un calcul permet de déterminer la concentration de l'ensemble albumine +  $\alpha$ -globulines ;
- tube D : il y a précipitation de toutes les fractions globuliniques, un calcul permet de déterminer la concentration en albumine.

En conclusion, la concentration en protéines totales s'obtient à partir de l'absorbance du tube A ; la concentration en albumine s'obtient à partir de l'absorbance du tube D ; la concentration en  $\alpha$ -globulines s'obtient à partir de la différence des absorbances des tubes C et D ; la concentration en  $\beta$ -globulines s'obtient à partir de la différence des absorbances des tubes B et C et la concentration en  $\gamma$ -globulines s'obtient à partir de la différence des absorbances des tubes A et B.

Les différents dosages sont tous menés d'une manière identique. La concentration en protéines d'une fraction X est obtenue à partir de la loi de Beer-Lambert :  $A_X = a \cdot l \cdot C_X$ , d'où  $C_X = A_X / (l \cdot a)$ . Il faut encore tenir compte des dilutions effectuées, soit un facteur  $f = 5/1$  lors de la réaction du biuret et un facteur  $f' = 10,5/0,5 = 21$  lors des précipitations. Donc :

$$C_X = A_X \cdot 5 \cdot 21 / (l \cdot 0,376) \text{ en g} \cdot \text{L}^{-1}$$

Connaissant la concentration en protéines totales et la concentration d'une fraction donnée, il est alors facile de calculer le pourcentage de cette fraction par rapport aux protéines totales.

Remarque : les pourcentages des différentes fractions pourraient être plus rapidement obtenus en faisant directement le rapport des absorbances adéquates, tous les dosages étant menés de manière similaire. Cette approche ne donne évidemment pas les concentrations des fractions en  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Application numérique :

| Fraction                                | Protéines totales | Albumine | $\alpha$ -Globuline | $\beta$ -Globuline | $\gamma$ -Globuline |
|-----------------------------------------|-------------------|----------|---------------------|--------------------|---------------------|
| $C_X$ en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 78,8              | 48,3     | 6,70                | 10,3               | 13,4                |
| Pourcentage                             | 100               | 61,3     | 8,50                | 13,1               | 17,0                |

**Exercice 18** Méthode de Warburg et Christian

1. Pour établir la relation mathématique permettant de calculer la concentration en protéines, il faut appliquer la règle d'additivité de la loi de Beer-Lambert. En appelant  $C_P$  la concentration en protéines en  $\text{g.L}^{-1}$  et  $C_{AN}$  la concentration en acides nucléiques également en  $\text{g.L}^{-1}$ , on a :

$$A_{260\text{ nm}} = 22,1 \cdot C_{AN} + 0,512 \cdot C_P \quad (\text{équation 1})$$

$$A_{280\text{ nm}} = 10,8 \cdot C_{AN} + 0,895 \cdot C_P \quad (\text{équation 2})$$

On tire  $C_{AN}$  de l'équation 2,

$$C_{AN} = (A_{280\text{ nm}} - 0,895 \cdot C_P) / 10,8$$

et on remplace dans l'équation 1.

$$A_{260\text{ nm}} = 22,1 \cdot \frac{(A_{280\text{ nm}} - 0,895 \cdot C_P)}{10,8} + 0,512 \cdot C_P$$

$$A_{260\text{ nm}} = 2,046 \cdot A_{280\text{ nm}} - 1,831 \cdot C_P + 0,512 \cdot C_P = 2,046 \cdot A_{280\text{ nm}} - 1,319 \cdot C_P$$

$$C_P = 1,55 \cdot A_{280\text{ nm}} - 0,758 \cdot A_{260\text{ nm}}$$

2. Pour une solution de protéines pures, on a  $(A_{280\text{ nm}} / A_{260\text{ nm}}) = 0,895 / 0,512 = 1,75$

Dans l'exemple étudié, le rapport est de  $0,610 / 0,452 = 1,35$ . La solution protéique n'est donc pas pure, mais contaminée par des fractions nucléiques.

$$C_P = 1,55 \cdot 0,610 - 0,758 \cdot 0,452 = 0,603 \text{ g.L}^{-1}$$

et, compte tenu des dilutions, facteur  $f = 3/1 = 3$  dans la cuve de mesure spectrophotométrique et  $f' = 100/10 = 10$  lors de la redissolution du précipité

$$C_P = 0,603 \cdot 3 \cdot 10 = 18,1 \text{ g.L}^{-1}$$

**Exercice 19** Dialyse à l'équilibre

On étudie l'interaction :



L'équation de Scatchard est la suivante :

$$[L \text{ lié}] / [L \text{ libre}] = -K_A \cdot [L \text{ lié}] + K_A \cdot n \cdot [P]$$

Il s'agit d'une relation dans laquelle  $[L \text{ lié}]$  est la concentration en ligand lié,  $[L \text{ libre}]$  la concentration en ligand libre,  $K_A$  la constante d'association du complexe PL,  $n$  le nombre de sites récepteurs pour le ligand sur la protéine et  $[P]$  la concentration en protéine.

La représentation de Scatchard consiste à visualiser  $[L \text{ lié}] / [L \text{ libre}] = f \cdot ([L \text{ lié}])$  (voir résumé de cours). La pente de la droite obtenue (dans le cas de sites équivalents et indépendants) est égale à  $K_A$  ou  $1/K_D$  ( $K_D$  étant la constante de dissociation du complexe PL) et l'abscisse à l'origine des ordonnées est égale à  $n \cdot [P]$ .

La concentration en ligand lié est égale à la différence des concentrations entre les compartiments I et II du dispositif de dialyse et la concentration en ligand libre est celle de la concentration dans le compartiment II.

|                                            |                      |                      |                      |                      |                      |
|--------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| $[L \text{ lié}]$ en $\text{mol.L}^{-1}$   | $2,25 \cdot 10^{-5}$ | $2,50 \cdot 10^{-5}$ | $2,75 \cdot 10^{-5}$ | $3,00 \cdot 10^{-5}$ | $3,25 \cdot 10^{-5}$ |
| $[L \text{ libre}]$ en $\text{mol.L}^{-1}$ | $6,43 \cdot 10^{-6}$ | $8,33 \cdot 10^{-6}$ | $1,10 \cdot 10^{-5}$ | $1,50 \cdot 10^{-5}$ | $2,17 \cdot 10^{-5}$ |
| $[L \text{ lié}] / [L \text{ libre}]$      | 3,5                  | 3,0                  | 2,5                  | 2,0                  | 1,5                  |

L'équation de la droite de Scatchard est alors :  $[L \text{ lié}] / [L \text{ libre}] = -199 \cdot 10^3 \cdot [L \text{ lié}] + 7,97$  (en se limitant à 3 chiffres significatifs).

$K_A = 199 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ , donc  $K_D = 1 / 199 \cdot 10^3 \text{ mol.L}^{-1}$ , soit environ  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ .

L'abscisse à l'origine des ordonnées est égale à  $7,97 / 199 \cdot 10^3$ , soit  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . D'après ce qui a été dit précédemment, cette valeur est égale à :

$$n \cdot [P], \text{ d'où } n = 4 \cdot 10^{-5} / 2 \cdot 10^{-5} = 2$$

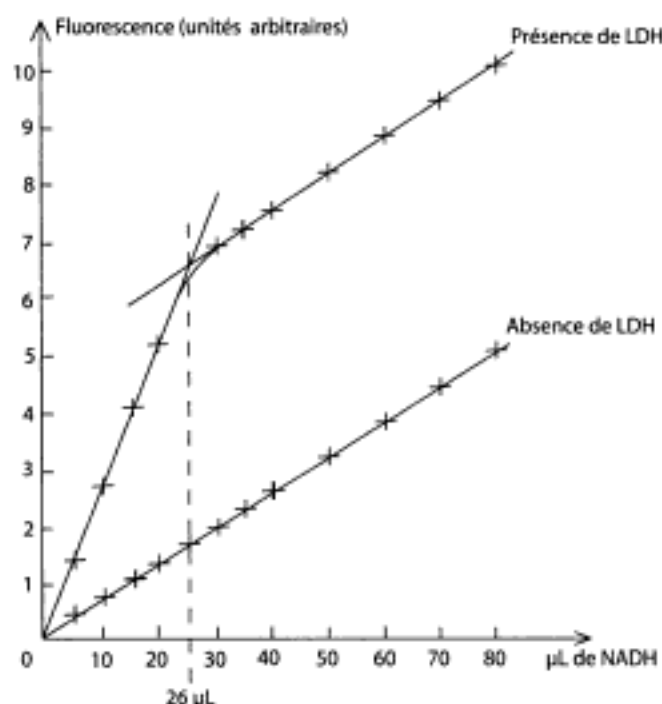
Chaque molécule protéique possède donc deux sites de fixation équivalents et indépendants pour le ligand.

## Exercice 20

## Interaction lactate déshydrogénase (LDH) et nicotinamide adénine dinucléotide (NADH)

## 1. Détermination du nombre de sites de la LDH pour le NADH

## 1.1. Tracé des courbes de la variation de la fluorescence F en fonction du volume de NADH ajouté :



La courbe de la variation de la fluorescence en l'absence de LDH traduit la fluorescence de NADH libre. La courbe de la variation de la fluorescence en présence de LDH montre que la fluorescence augmente plus rapidement qu'en l'absence de LDH ; NADH se lie à la LDH.

Sur cette même dernière courbe, on observe une rupture de pente (après un volume de NADH d'environ 26 µL) ; la LDH est alors saturée par le NADH. Ensuite, la fluorescence continue d'augmenter avec l'addition de NADH, mais avec un coefficient directeur identique à celui de la variation de la fluorescence en l'absence de LDH ; le NADH ajouté est alors à nouveau libre.

1.2. Détermination de sites  $n$  de la LDH pour NADH

Le nombre de moles de NADH nécessaires pour saturer la LDH est :

$$n_{\text{NADH}} = c_{\text{NADH}} \cdot V_{\text{NADH}} \quad \text{soit} \quad n_{\text{NADH}} = 10^{-3} \cdot 26 \cdot 10^{-6} = 26 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$$

Le nombre de moles de LDH présentes dans l'expérience est

$$n_{\text{LDH}} = c_{\text{LDH}} \cdot V_{\text{LDH}} / M_{\text{LDH}} \quad \text{soit} \quad n_{\text{LDH}} = 0,473 \cdot 2 \cdot 10^{-3} / 150000 = 6,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$$

$$n \text{ (nombre de sites de fixation)} = n_{\text{NADH}} / n_{\text{LDH}} = 26 \cdot 10^{-9} / 6,3 \cdot 10^{-9} = 4,13$$

soit 4 sites de fixation de NADH par mole de LDH.

1.3. Conclusion : la LDH possédant 4 sous-unités, il est logique de penser qu'il y a un site de fixation par sous-unité.

## 2. Exploitation des résultats expérimentaux par la modélisation de Scatchard

## 2.1. Calcul des concentrations en NADH total

La solution de NADH ajoutée subit une dilution dans le milieu de mesure de la fluorescence, donc les concentrations en NADH total ou  $[\text{NADH total}]$  se calculent de la manière suivante :

$$1 \cdot 10^{-3} \cdot v_{\text{NADH}} \cdot 10^{-6} / 2 \cdot 10^{-3} \text{ en mol.L}^{-1} \text{ avec } v_{\text{NADH}} \text{ exprimé en } \mu\text{L}$$

Le tableau des résultats expérimentaux devient :

|                                                        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Numéro de l'expérience                                 | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   |
| NADH ajouté en µL                                      | 0,0  | 5,0  | 10   | 15   | 20   | 25   | 30   | 35   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   |
| F avec LDH en UA                                       | 0,0  | 1,3  | 2,5  | 3,9  | 5,1  | 6,1  | 6,8  | 7,2  | 7,5  | 8,1  | 8,8  | 9,4  | 10   |
| F sans LDH en UA                                       | 0,0  | 0,3  | 0,6  | 0,9  | 1,2  | 1,6  | 1,9  | 2,2  | 2,5  | 3,1  | 3,8  | 4,4  | 5,0  |
| $[\text{NADH total}] \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ | 0,00 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1,00 | 1,25 | 1,50 | 1,75 | 2,00 | 2,50 | 3,00 | 3,50 | 4,00 |

## 2.2. Calcul des fluorescences spécifiques

La fluorescence spécifique de NADH libre  $a$  se calcule à partir des résultats obtenus en l'absence de LDH. Elle est numériquement égale au coefficient directeur de la droite  $F = f(v_{\text{NADH}})$ , soit, après avoir calculé les concentrations correspondant au volume de NADH ajouté,  $a = 1,26 \cdot 10^5 \text{ UA} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

La fluorescence spécifique de NADH lié  $b$  se calcule à partir des résultats obtenus en présence de LDH et quand le NADH se fixe sur l'enzyme, c'est-à-dire pour les expériences 2 jusqu'à 5. En procédant comme précédemment, on trouve  $b = 5,12 \cdot 10^5 \text{ UA} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

## 2.3. Exploitation des résultats des expériences 6 et 7

Pour l'expérience 6, compte tenu de la donnée figurant dans l'énoncé à la question 2.3, on a :

$$6,1 = [\text{NADH libre}] \cdot 1,26 \cdot 10^5 + [\text{NADH lié}] \cdot 5,12 \cdot 10^5 \text{ (équation 1)}$$

De plus, on a :

$$[\text{NADH libre}] + [\text{NADH lié}] = [\text{NADH total}] = 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ (équation 2)}$$

De l'équation 2, on tire  $[\text{NADH libre}] = 1,25 \cdot 10^{-5} - [\text{NADH lié}]$  que l'on remplace dans l'équation 1, ce qui donne :

$$6,1 = (1,25 \cdot 10^{-5} - [\text{NADH lié}]) \cdot 1,26 \cdot 10^5 + [\text{NADH lié}] \cdot 5,12 \cdot 10^5$$

La résolution de cette équation donne  $[\text{NADH lié}] = 1,17 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Par introduction de cette valeur dans l'équation 2, on trouve  $[\text{NADH libre}] = 8,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

En procédant de même pour les résultats de l'expérience 7, on a :

$$[\text{NADH lié}] = 1,27 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ et } [\text{NADH libre}] = 2,30 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

## 2.4. Equation de Scatchard

L'équation de Scatchard s'écrit de la manière suivante dans ce cas :

$$[\text{NADH lié}] / [\text{NADH libre}] = -K_A \cdot [\text{NADH lié}] + K_A \cdot n \cdot [P] = -[\text{NADH lié}] / K_D + n \cdot [P] / K_D$$

Pour l'expérience 6, on a :

$$[\text{NADH lié}] / [\text{NADH libre}] = 1,17 \cdot 10^{-5} / 8,00 \cdot 10^{-7} = 14,6 = -1,17 \cdot 10^{-5} / K_D + n \cdot [P] / K_D$$

ou encore en isolant  $K_D$ ,

$$14,6 \cdot K_D = -1,17 \cdot 10^{-5} + n \cdot [P]$$

Pour l'expérience 7, en procédant de même, on a :  $5,52 \cdot K_D = -1,27 \cdot 10^{-5} + n \cdot [P]$

La résolution de ce système de 2 équations à 2 inconnues donne  $K_D = 1,10 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  et  $n \cdot [P] = 1,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Or

$$[P] = 0,473 / 150000 = 3,15 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

donc  $n = 1,33 \cdot 10^{-5} / 3,15 \cdot 10^{-6}$  soit pratiquement 4. Cette valeur de  $n$  concorde avec celle obtenue à la question 1.2.

Exercice 21

## Interaction toxine et récepteur

## 1. Représentation de Scatchard

Le comptage de la radioactivité au niveau du filtre de DEAE-cellulose permet de calculer les concentrations en toxine liée soit  $[T \text{ liée}]$  et le comptage au niveau du filtrat celles de la toxine libre soit  $[T \text{ libre}]$ .

$$0,87 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1} = 0,87 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1} = 0,87 \cdot 2,22 \cdot 10^{22} \text{ CPM} \cdot \text{mol}^{-1} = 1,93 \cdot 10^{12} \text{ CPM} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Les  $[T \text{ liée}]$  et  $[T \text{ libre}]$  en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  s'obtiennent en divisant les CPM mesurés par le facteur  $1,93 \cdot 10^{12}$ . Cela donne, en se limitant à 3 chiffres significatifs pour le calcul des concentrations :

| Numéro de l'expérience                                  | 1                     | 2                     | 3                     | 4                     | 5                     | 6                     |
|---------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| $[T \text{ liée}]$ en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  | $2,02 \cdot 10^{-11}$ | $4,04 \cdot 10^{-11}$ | $6,01 \cdot 10^{-11}$ | $8,03 \cdot 10^{-11}$ | $12,1 \cdot 10^{-11}$ | $16,0 \cdot 10^{-11}$ |
| $[T \text{ libre}]$ en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | $1,16 \cdot 10^{-10}$ | $2,63 \cdot 10^{-10}$ | $4,61 \cdot 10^{-10}$ | $7,38 \cdot 10^{-10}$ | $18,3 \cdot 10^{-10}$ | $73,1 \cdot 10^{-10}$ |
| $[T \text{ liée}] / [T \text{ libre}]$                  | 0,174                 | 0,154                 | 0,132                 | 0,109                 | 0,0661                | 0,0219                |

L'équation de la représentation de Scatchard (en prenant en compte les concentrations non arrondies) est la suivante (avec  $n$  = nombre de site(s) récepteur(s) et  $[R]$  = concentration en récepteur) :

$$[T \text{ liée}] / [T \text{ libre}] = -[T \text{ liée}] / K_D + n \cdot [R] / K_D = -1,0885 \cdot 10^9 \cdot [T \text{ liée}] + 196,87 \cdot 10^7$$

Il s'en suit que  $K_D = 1 / 1,0885 \cdot 10^9 = 9,19 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ . L'abscisse à l'origine soit  $n.[R]$  est de :

$$196,87 \cdot 10^{-3} / 1,0885 \cdot 10^9 = 1,81 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$$

Comme  $[R] = 1,80 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $n$  est donc ici égal à 1.

## 2. Représentation en double inverse

La  $[T \text{ liée}]$  a déjà été calculée à la question 1. Pour ce qui est de la concentration en toxine totale ou  $[T \text{ totale}]$ , elle s'obtient par le calcul à partir de l'addition des CPM mesurés sur le filtre et les CPM mesurés au niveau du filtrat. Comme précédemment, on divise alors le total obtenu par le facteur  $1,93 \cdot 10^{12}$  pour avoir les concentrations en  $\text{mol.L}^{-1}$ . Cela donne :

| Numéro de l'expérience                          | 1                     | 2                     | 3                     | 4                     | 5                     | 6                     |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| $[T \text{ liée}]$ en $\text{mol.L}^{-1}$       | $2,02 \cdot 10^{-11}$ | $4,04 \cdot 10^{-11}$ | $6,01 \cdot 10^{-11}$ | $8,03 \cdot 10^{-11}$ | $12,1 \cdot 10^{-11}$ | $16,0 \cdot 10^{-11}$ |
| $1 / [T \text{ liée}]$ en $\text{L.mol}^{-1}$   | $4,95 \cdot 10^{10}$  | $2,47 \cdot 10^{10}$  | $1,66 \cdot 10^{10}$  | $1,25 \cdot 10^{10}$  | $8,28 \cdot 10^9$     | $6,23 \cdot 10^9$     |
| $[T \text{ totale}]$ en $\text{mol.L}^{-1}$     | $1,36 \cdot 10^{-10}$ | $3,03 \cdot 10^{-10}$ | $5,21 \cdot 10^{-10}$ | $8,18 \cdot 10^{-10}$ | $1,95 \cdot 10^{-9}$  | $7,47 \cdot 10^{-9}$  |
| $1 / [T \text{ totale}]$ en $\text{L.mol}^{-1}$ | $7,37 \cdot 10^9$     | $3,30 \cdot 10^9$     | $1,92 \cdot 10^9$     | $1,22 \cdot 10^9$     | $5,13 \cdot 10^8$     | $1,34 \cdot 10^8$     |

L'équation de la représentation  $1 / [T \text{ liée}] = f(1 / [T \text{ totale}])$  est  $1 / [T \text{ liée}] = 5,9956 / [T \text{ totale}] + 5,1913 \cdot 10^9$ .

Par analogie avec l'enzymologie (représentation en doubles inverses de Lineweaver et Burk), l'abscisse à l'origine est égale à  $-1 / K_D$ , donc :

$$K_D = 5,9956 / 5,1913 \cdot 10^9 = 1,15 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$$

En enzymologie, la vitesse initiale traduit une réaction entre l'enzyme et son substrat. Ici, le complexe  $R \cdot T$  formé traduit une réaction entre la toxine et le récepteur. Donc, l'ordonnée à l'origine donne  $1 / [T \text{ liée}]_{\text{max}}$  :

$$[T \text{ liée}]_{\text{max}} = 1 / 5,1913 \cdot 10^9 = 1,93 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$$

Comme  $[R] = 1,8 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ , il y a un seul site de fixation de toxine par mole de récepteur.

L'accord avec les résultats obtenus à la question 1 est donc satisfaisant.

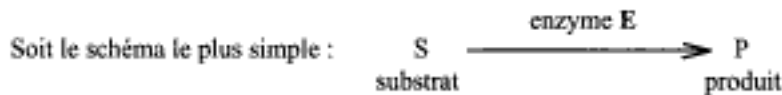
La méthode des double inverse en enzymologie a été développée pour un seul site de fixation de substrat par mole d'enzyme. L'interaction protéine ligand, de même, ne peut être étudiée par la technique des double inverse que dans le cas d'un seul site d'interaction.

## 5 - Enzymes

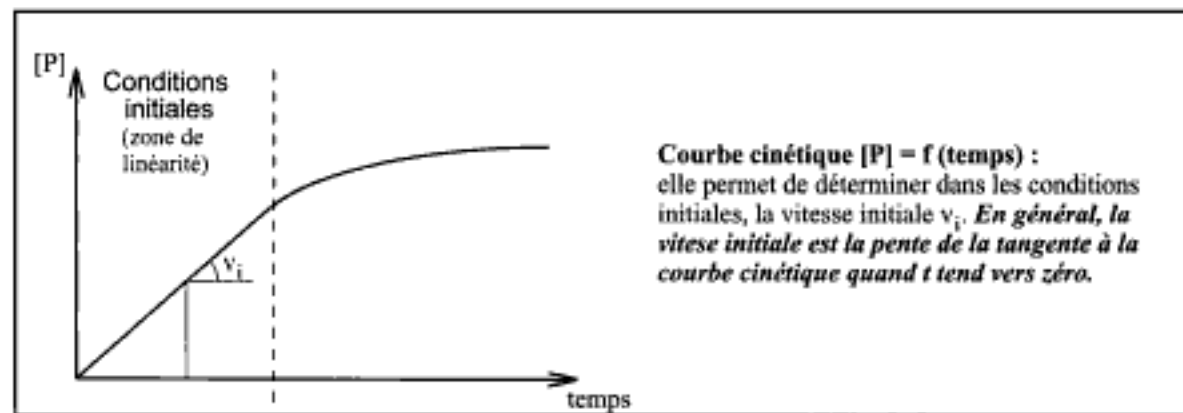
Les enzymes sont des catalyseurs biologiques :

- elles augmentent la vitesse des réactions catalysées par diminution de l'énergie d'activation ;
- elles ne modifient pas l'état d'équilibre de la réaction catalysée ;
- elles agissent quand elles sont présentes en petites quantités ;
- elles permettent des interactions biospécifiques, d'où la spécificité enzymatique et une régulation possible de l'activité.

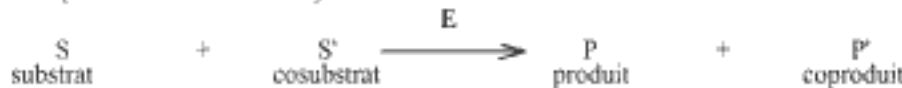
### 1. Vitesse de réaction, activité enzymatique et modes d'expression



Dans l'étude cinétique d'une enzyme, on considère classiquement la vitesse initiale de réaction notée  $v_i$  ou  $v_0$ . Cette vitesse initiale s'exprime (en batch) par  $v_i = d[P] / dt$ , c'est à dire la pente de la courbe  $P = f(\text{temps})$  au point d'abscisse  $t$  dans les conditions initiales. La vitesse initiale peut être assimilée à "l'activité enzymatique", ceci dans certaines conditions.



En réalité, il y a, la plupart du temps, plusieurs substrats et plusieurs produits : exemple de deux substrats et de deux produits (réaction dite "Bi - Bi")



*Représentation de CLELAND*

A, B ; substrats dans leur ordre d'intervention  
P, Q ; produits dans leur ordre de départ  
E, F ; enzyme sous ses diverses formes

Ces notions seront développées plus loin.



L'**activité d'une enzyme** est le fait d'une capacité d'activité catalytique dans des conditions expérimentales bien définies : concentration initiale en substrat, pH, température, concentration en enzyme, ...

Ses modes d'expression sont :

- les **unités internationales** ou **UI** : 1 UI représente la quantité d'enzyme permettant la transformation d'une micromole de substrat par min ;
- les **katal** (ou **kat**) : 1 kat représente la quantité d'enzyme transformant une mole de substrat par seconde.

Cette activité est classiquement ramenée :

- à l'unité de volume de la solution enzymatique (**concentration d'activité catalytique** ou **CAC** encore appelée concentration d'activité enzymatique ou **CAE**, en UI par unité de volume ou kat par unité de volume) ;
- à la masse d'enzyme (activité spécifique ou **AS** en UI par unité de masse ou kat par unité de masse) ;
- à la quantité de matière transformée par mole d'enzyme (activité enzymatique molaire ou **AEM**, encore appelée activité molaire spécifique ou **AMS**).



## 2. Extraction - purification ; enrichissement et rendement

### 2.1. Extraction

- Mise en solution d'une enzyme emprisonnée dans une structure biologique ;
- obtention d'un extrait brut après séparation liquide - solide.

### 2.2. Purification

Elimination des protéines contaminantes d'où l'augmentation de l'activité spécifique

**Enrichissement (E) ou degré de purification :**  
rapport de l'activité spécifique après purification  $AS_2$   
à l'activité spécifique avant purification  $AS_1$

$$E = AS_2 / AS_1$$

Le taux d'enrichissement ou taux de purification est supérieur à 1.

**Rendement (R) ou pourcentage de récupération:**  
rapport de l'activité totale après  
purification  $AT_2$  à l'activité totale avant  
purification  $AT_1$

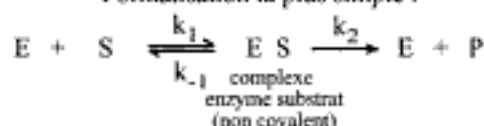
$$R = AT_2 \cdot 100 / AT_1$$

Le taux de rendement ou pourcentage de récupération est inférieur à 100 %.

## 3. Facteurs déterminant l'activité enzymatique

### 3.1. Concentration en substrat ; équation de Michaelis - Menten ; paramètres cinétiques

Formalisation la plus simple :



Equation de Michaelis - Menten

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

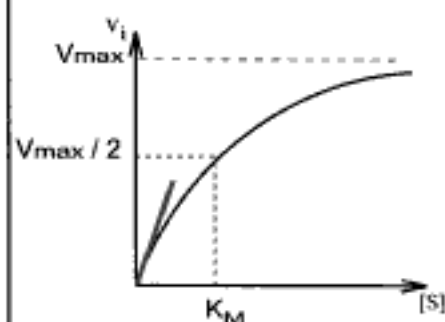
$V_{max}$  et  $K_M$  sont les paramètres cinétiques de l'enzyme.

$K_M$  : [S] pour laquelle  $v_i = V_{max} / 2$  ; ici  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Généralement  $k_2 \ll k_{-1}$ ,  $K_M$  est la constante de dissociation du complexe enzyme substrat ES c'est-à-dire inverse de l'affinité de E pour S.

$V_{max}$  : vitesse initiale maximale : valeur (théorique) maximale que peut atteindre la  $v_i$  lorsque la concentration en substrat est saturante ( $[S] > 10 \cdot K_M$ ).

**Représentation de Michaelis - Menten**  
modélisable par une branche d'hyperbole



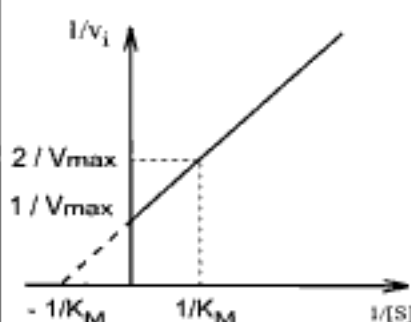
$$v_i = k_1 [S] - k_{-1} [S]$$

Réaction d'ordre 1

$[S] \ll K_M$

Application : dosage enzymatique de substrat

**Représentation de Lineweaver et Burk**  
(dite "en double inverse")



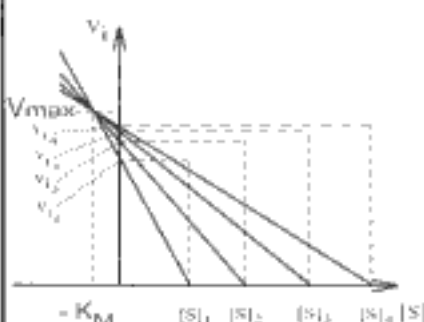
$$v_i = k_2 [ES] = V_{max} \cdot [S] / (K_M + [S])$$

Réaction d'ordre 0

$[S] \gg K_M$

Application : détermination d'activité enzymatique

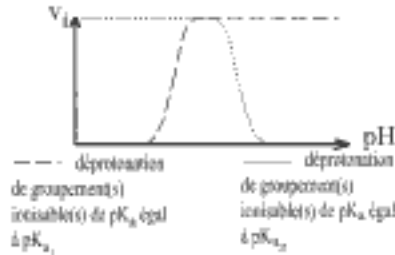
**Grappe linéaire directe ou représentation de Eisenthal et Cornish-Bowden**  
(méthode implémentée dans Regressi)



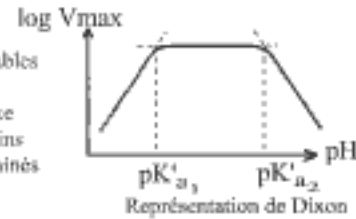
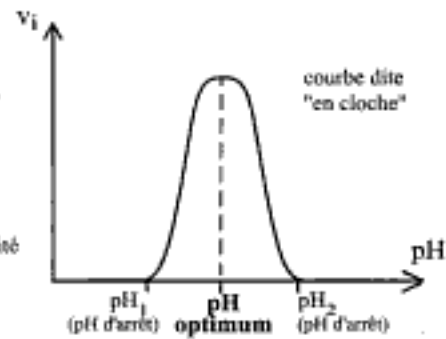
### 3.2. pH

La réaction enzymatique a besoin pour se dérouler d'une ionisation convenable des acides aminés du site actif (et du substrat) ; cette ionisation dépend du pH et doit être maintenue constante durant la manipulation, d'où l'emploi d'un tampon à un pH proche du pH optimum (pH pour lequel l'activité est maximale).

pH d'arrêt : pH en deçà de pH<sub>1</sub> et au-delà de pH<sub>2</sub> pour lesquels il n'y a plus d'activité enzymatique (inactivation de l'enzyme).



Les pK<sub>a</sub> des groupements ionisables des chaînes latérales des acides aminés engagés dans le complexe michaelien diffèrent plus ou moins fortement de ceux des acides aminés libres.



### 3.3. Température

L'effet de la température est la résultante de deux effets :

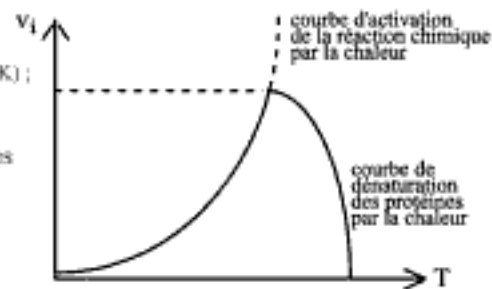
- activation par l'augmentation de température

$$k = C e^{-E_a/RT} \quad (\text{loi d'Arrhenius})$$

k : constante de vitesse (r<sup>-1</sup>) ; C : constante ;  
E<sub>a</sub> : énergie d'activation (J . mol<sup>-1</sup>) ; T : température absolue (K) ;  
R : constante des gaz parfaits (8,32 J . mol<sup>-1</sup> . K<sup>-1</sup>).

- dénaturation par la chaleur liée à la nature protéique des enzymes

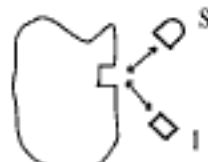
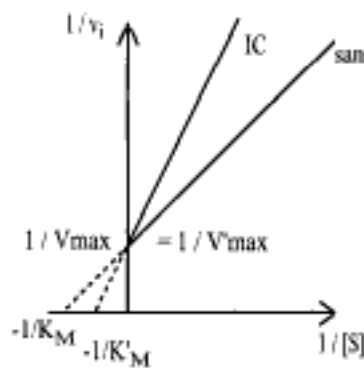
en général :  $E_N \xrightarrow{k_d} E_D$  ; réaction d'ordre 1 d'où  
 $[E_N] = [E_{No}] \cdot e^{-k_d \cdot t}$   
E<sub>N</sub> : enzyme native après dénaturation t minutes  
à une température de dénaturation T<sub>D</sub> ;  
E<sub>No</sub> : enzyme native ; E<sub>D</sub> : enzyme dénaturée ;  
k<sub>d</sub> : constante de vitesse de dénaturation (r<sup>-1</sup>).



### 3.4. Effecteurs michaeliens et allostériques

#### 3.4.1. Effecteurs michaeliens

##### Inhibition compétitive (IC)



$$V^*_{max} = V_{max}$$

$$K^*_M = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) = K_M \cdot F_i$$

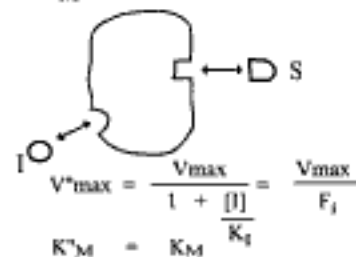
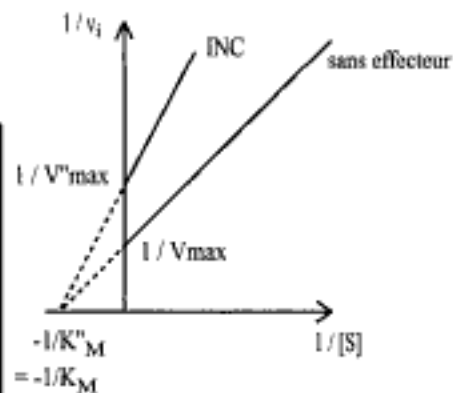
I souvent analogue structural de S

##### Inhibition incompétitive :

fixation de l'inhibiteur sur le complexe E S ;  $V^*_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} = \frac{V_{max}}{F_i}$

$$K^*_M = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}} = \frac{K_M}{F_i}$$

##### Inhibition non compétitive (INC)



## 3.4.2. Effecteurs allostériques

Effecteurs d'enzymes allostériques, c'est à dire d'enzymes à structure oligomérique caractérisée par :

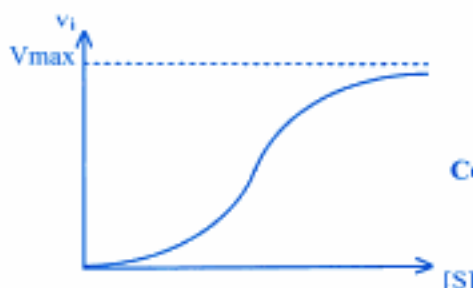
- l'existence de sous unités (SU) en nombre pair : chaque sous unité a un site pour le substrat et / ou pour l'effecteur ;
- une cinétique le plus souvent sigmoïde (en forme de " S ").



n : nombre de sites de fixation

Equation de Hill

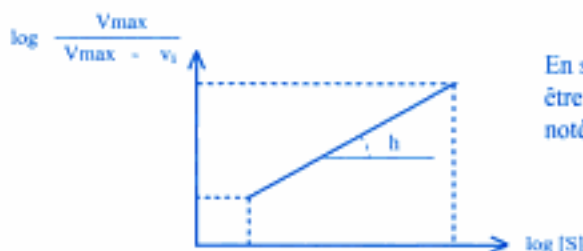
$$v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{K + [S]^h}$$



Courbe sigmoïde

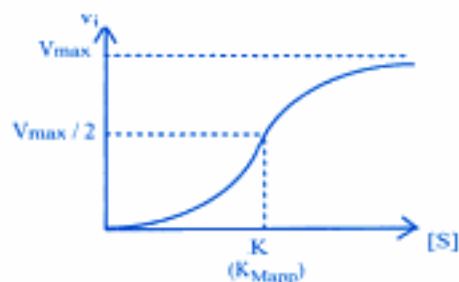
Détermination de l'indice de coopérativité h : représentation de Hill  
En général  $h < n$

$$\log \frac{V_{max}}{V_{max} - v_i} = h \cdot (\log [S]) - \log K$$

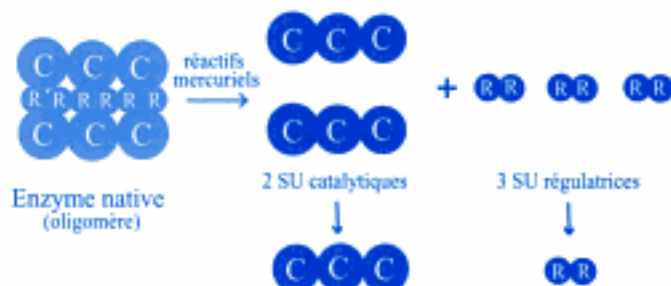


En simplifiant, la constante K peut être assimilée à un  $K_M$  apparent noté  $K_{Mapp}$ .

Majorité des enzymes de type K  
(même  $V_{max}$ ,  $K_{Mapp}$  modifié)



Exemple : Aspartate carbamyl transférase (ACT)



Chaque SU catalytique est constituée de  
3 chaînes C de 34000 Da ;  
3 sites de fixation pour S ;  
activité enzymatique mais aucune sensibilité au CTP.

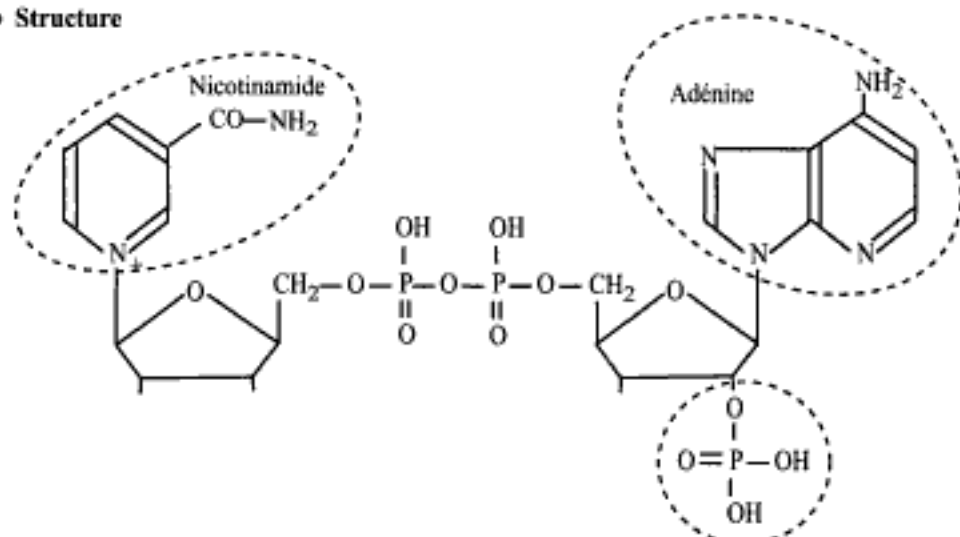
Chaque SU régulatrice est constituée de  
2 chaînes R de 17000 Da ;  
un  $Zn^{2+}$  par chaîne ;  
chaque chaîne fixe un CTP.

## 4. Les coenzymes

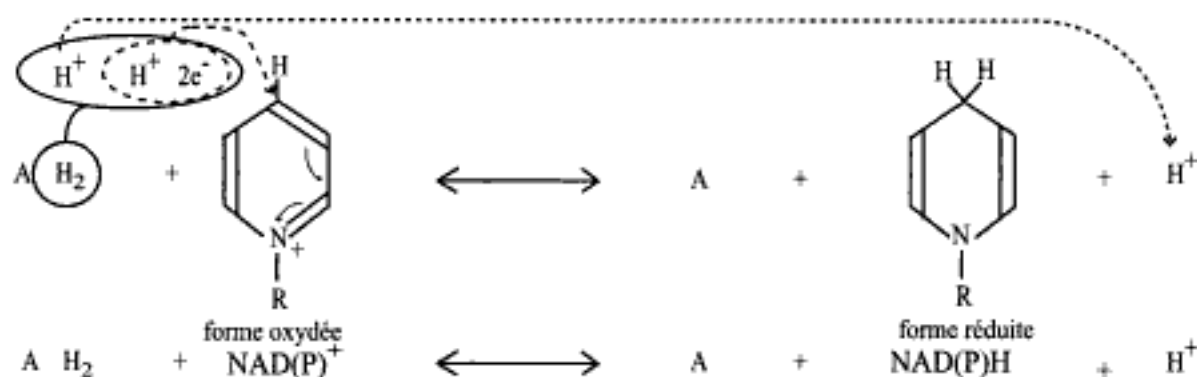
Molécules organiques liées à la partie protéique de l'enzyme (apoenzyme) et indispensables à l'activité enzymatique.

Un exemple important du point de vue théorique (métabolisme) et technologique :  
le  $\text{NAD(P)}^+$  ou **nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)**

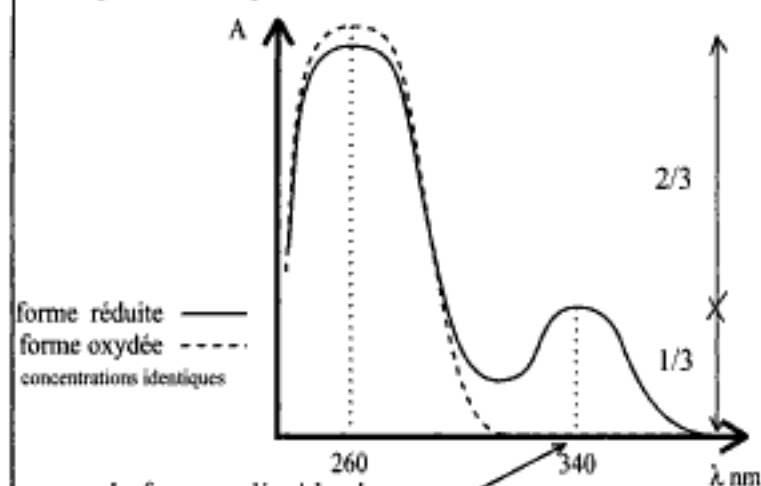
### • Structure



### • Mécanisme d'action



### • Spectre d'absorption moléculaire



La forme oxydée n'absorbe pas à 340 nm, d'où l'intérêt technologique.

|                             | $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ | $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| $\epsilon_{340 \text{ nm}}$ | 6300                                                  | 630                                |
| $\epsilon_{365 \text{ nm}}$ | 3400                                                  | 340                                |

## 5. Détermination d'activités enzymatiques



### Conditions expérimentales :

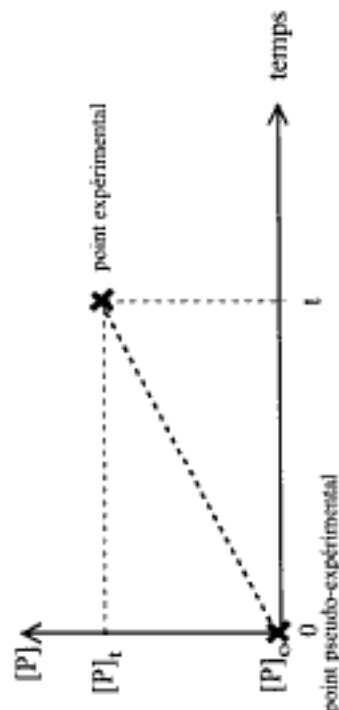
- enzyme à doser présente en quantité limitante ;
- $[S] > K_M$  ;  $[S'] > K'_M$  (en fait  $[S] > 10 K_M$  ou  $10 K'_M$ ) ;
- pH fixé par un tampon (pH fixé et constant) ;
- température fixée d'une manière précise et constante ;
- force ionique fixée par un tampon ;
- présence d'effecteurs (méthodes optimisées).

### Méthode en deux points

Mesure de la quantité de produit formé au bout d'un temps  $t$  ;

pas de vérification des conditions initiales

Technologie mise en oeuvre : colorimétrie (avec les contraintes habituelles des colorimétries)

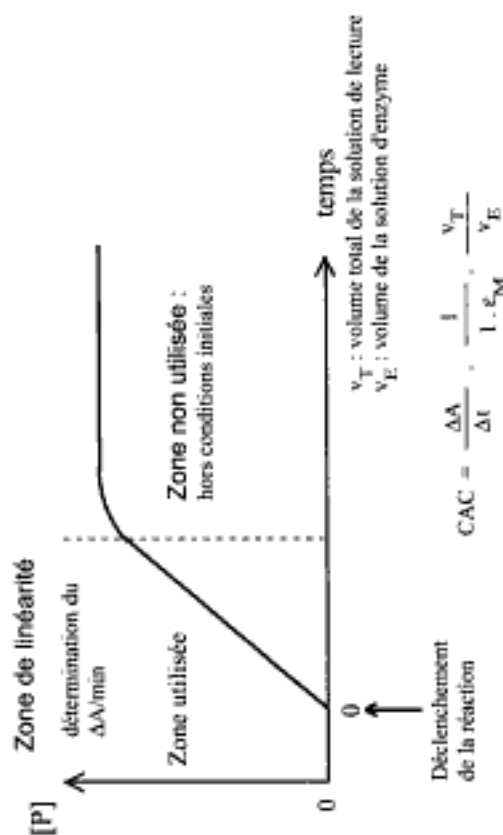


$$CAC = k \cdot \frac{[P]_t - [P]_0}{(t - 0)} = k \cdot \frac{[P]_t}{t}$$

$k$  : constante dépendant de  $[E]$

### Méthode cinétique

Suivi de l'apparition du produit et mesure de la vitesse initiale le plus souvent par spectrophotométrie (utilisation de propriétés spectrales)  
Technologie mise en oeuvre : spectrophotométrie (utilisation des  $\epsilon_{\lambda}$ )



## 6. Dosage de substrats



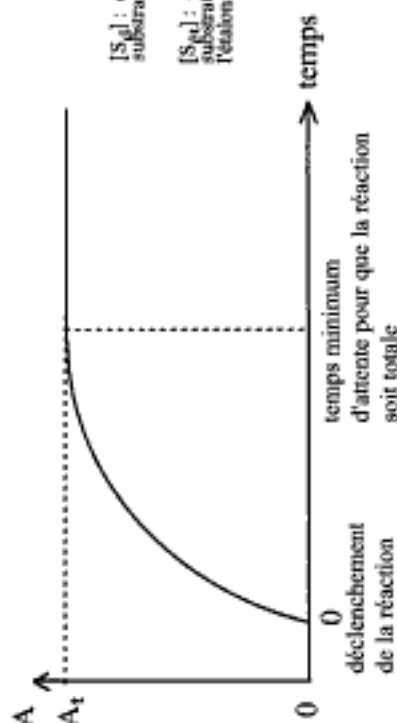
### Conditions expérimentales :

- substrat (à doser) : facteur limitant amené par le milieu à doser ;
- [E] suffisante pour un temps de réaction assez court ;
- pH fixé par un tampon (pH fixé et constant) ;
- température fixée (surtout pour les méthodes cinétiques) ;
- force ionique fixée par un tampon.

### Méthode en point final

Mesure de la quantité de produit P (ou coproduit P') formé (ou de cosubstrat S' consommé) après transformation totale du substrat.

Technologie mise en oeuvre : colorimétrie (avec les contraintes afférentes) ou spectrophotométrie.



Colorimétrie  $[S_d] = [S_{ét}] \cdot \frac{A_{ét}}{A_t}$

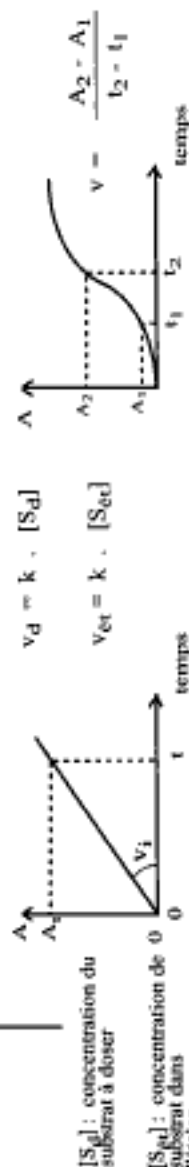
Spectrophotométrie  $[S_{ét}] = A_t \cdot \frac{1}{\epsilon_M \cdot l} \cdot \frac{V_T}{V_S}$

$A_t$  : absorbance finale du dosage  
 $A_{ét}$  : absorbance finale d'un étalon de concentration notée  $[S_{ét}]$   
 $V_T$  : volume total de la solution de lecture  
 $V_S$  : volume de solution à doser

### Méthodes cinétiques

Détermination de la vitesse initiale dans des conditions où  $[S] \ll K_M$  ; alors,  $v_i = k \cdot [S]$  ou  $v = k \cdot [S]$  (ordre 1 par rapport à S)

Technologie mise en oeuvre : spectrophotométrie ; nécessité d'étalonner avec une solution de substrat de concentration connue.



Cinétique linéaire en temps fixé : une seule lecture d'absorbance à un temps  $t$  ; le rapport de cette absorbance au temps (vitesse) est alors proportionnel à la concentration en substrat.

Cinétique non linéaire en temps fixé : deux lectures d'absorbance  $A_1$  et  $A_2$  à deux temps différents ; la variation d'absorbance rapportée au temps (vitesse moyenne) est alors proportionnelle à la concentration en substrat.

- Méthodes rapides bien adaptées à l'automatisation.

$[S_d] = [S_{ét}] \cdot \frac{v_d}{v_{ét}}$   
 $v_d$  : vitesse mesurée pour le dosage  
 $v_{ét}$  : vitesse mesurée pour l'étalonnage

## 7. Systèmes à deux substrats et deux produits (Bi - Bi)



### 7.1. Simple déplacement (complexe ternaire)

#### 7.1.1. Association au hasard ou aléatoire



Ce modèle peut être traité avec l'approximation de l'état stationnaire (à savoir  $d[EAB]/dt = d[EA]/dt = d[EB]/dt = 0$ ). On obtient une expression complexe dans laquelle la concentration en substrat intervient au carré. Celle-ci peut être simplifiée en admettant un quasi-équilibre entre E et les différents complexes ( $k_5$  négligeable par rapport aux autres constantes de vitesse) et la considération des diverses constantes d'équilibre :

$$K_A = [E] \cdot [A] / [EA] = k_{-1} / k_1, \quad K'_A = [EB] \cdot [A] / [EAB] = k_{-4} / k_4, \\
 K_B = [E] \cdot [B] / [EB] = k_{-2} / k_2, \quad K'_B = [EA] \cdot [B] / [EAB] = k_{-3} / k_3$$

#### Association indépendante

La fixation de A ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour B.

$$K_B = K'_B \text{ et, symétriquement, } K_A = K'_A$$

$$v_i = \frac{V_{\max}}{1 + K_A/[A] + K_B/[B] + K_A \cdot K_B / ([A] \cdot [B])}$$

#### Association dépendante

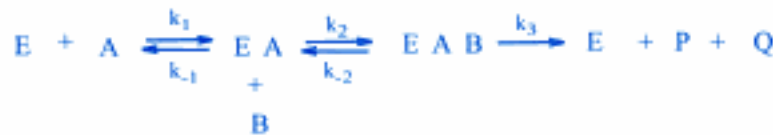
La fixation de A modifie l'affinité de l'enzyme pour B.

$$K_A \cdot K'_B = K'_A \cdot K_B$$

$$v_i = \frac{V_{\max}}{1 + K'_A/[A] + K'_B/[B] + K_A \cdot K'_B / [A] \cdot [B]}$$

#### 7.1.2. Association ordonnée ou séquentielle

schéma simplifié négligeant les complexes EP et EQ



$$v_i = \frac{V_{\max}}{1 + K_B/[B] + K_A \cdot K_B / [A] \cdot [B]}$$

### 7.2. Double déplacement (complexes binaires)

#### 7.2.1. Mécanisme "Ping-pong" : mécanisme séquentiel sans complexe ternaire



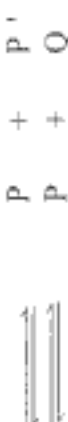
$$v_i = \frac{V_{\max}}{1 + K_A/[A] + K_B/[B]}$$

#### 7.2.2. Mécanisme de Theorell-Chance

Absence de complexe entre le second substrat et l'enzyme

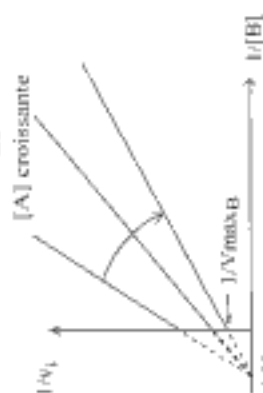
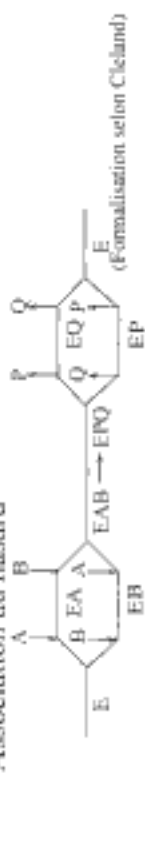
### 7.3. Etude expérimentale

Mesure de la vitesse initiale pour différentes concentrations d'un des substrats, ceci avec une concentration constante et identique de l'autre



#### Simple déplacement (complexes ternaires)

Association au hasard

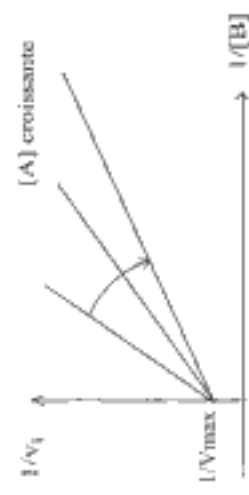


Association indépendante

$$K'_A = K_A \text{ et } K'_B = K_B$$

Les courbes  $1/v_i = f(1/[A])$  seraient de même aspect

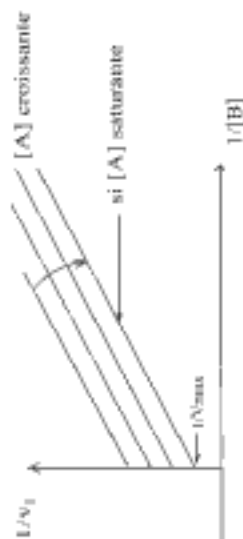
Association ordonnée ou séquencée



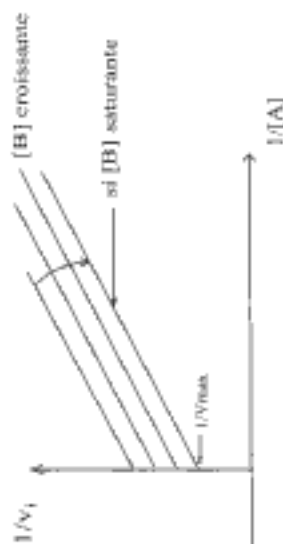
Les courbes  $1/v_i = f(1/[A])$  et  $1/v_i = g(1/[B])$  sont d'aspects différents

#### Double déplacement (complexes binaires)

Modèle "ping-pong"



Les courbes  $1/v_i = f(1/[A])$  et  $1/v_i = g(1/[B])$  sont des droites parallèles





## Énoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

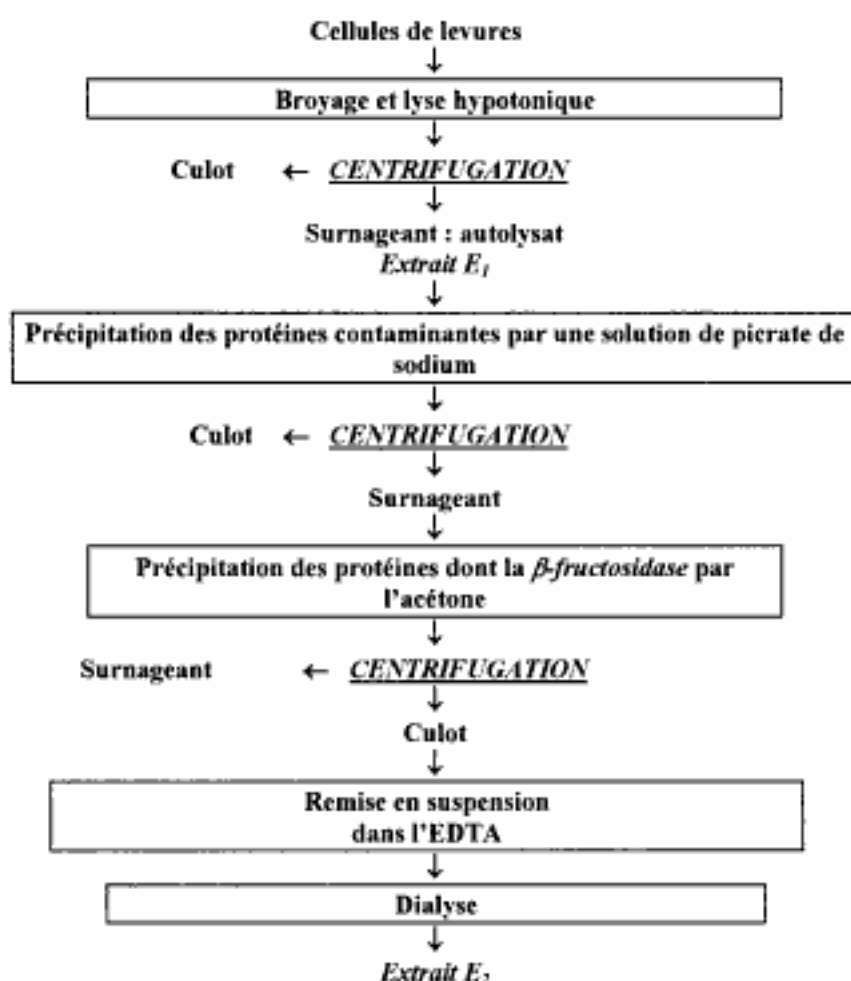
### Extraction - purification ; enrichissement et rendement

#### **Exercice 1** Etude de la $\beta$ -fructosidase de levure de boulangerie. Evaluation de la performance de la méthode d'extraction et de purification

L'enzyme est extraite de la levure et purifiée selon le protocole présenté dans le *document 1*.

##### Document 1

##### *Diagramme d'extraction et de purification partielle de la $\beta$ -fructosidase de levure*



On réalise sur chaque extrait ( $E_1$  et  $E_2$ ) un dosage de protéines. Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous :

| Extrait | Volume de l'extrait (mL) | Concentration massique en protéines ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Quantité de protéines totales (mg) | Concentration d'activité catalytique ( $\text{UI.mL}^{-1}$ ) | Activité spécifique ( $\text{UI.mg}^{-1}$ ) | Activité totale (UI) |
|---------|--------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|
| $E_1$   | 30,0                     | 1,19                                                      |                                    |                                                              |                                             |                      |
| $E_2$   | 9,50                     | 0,890                                                     |                                    |                                                              |                                             |                      |

1. Calculer la quantité de protéines totales de chaque extrait enzymatique.

2. Déterminer la concentration d'activité catalytique sachant que :

- l'équation de la droite d'étalonnage du spectrophotomètre pour le dosage du sucre inverti est :  $A = 0,160 \cdot q$  ( $A$  est l'absorbance et  $q$  la quantité de sucre inverti en  $\mu\text{mol}$  par tube) ;

- pour chaque dosage le protocole suivant est utilisé :

- introduire dans un tube à essai 1 mL d'extrait dilué ( $E_1$  au 1 / 50 et  $E_2$  au 1 / 100) et 1 mL de tampon acétate ;
- placer 5 minutes au bain-marie à + 25°C ;
- ajouter 1 mL de saccharose à 0,36 mol.L<sup>-1</sup> et laisser la réaction se dérouler 5 minutes exactement ;
- ajouter 2 mL de réactif au 3,5 DNS ;
- boucher les tubes avec du coton cardé et les porter 5 minutes exactement au bain-marie bouillant à + 100°C ;
- après refroidissement, ajouter 15 mL d'eau distillée et lire les absorbances à 530 nm contre le témoin réactif.

Les résultats obtenus sont les suivants :

| Extrait | Absorbance à $\lambda = 530$ nm. |
|---------|----------------------------------|
| $E_1$   | 0,624                            |
| $E_2$   | 0,768                            |

3. Déterminer l'activité spécifique en UI.mg<sup>-1</sup> et l'activité totale en UI de chaque extrait.

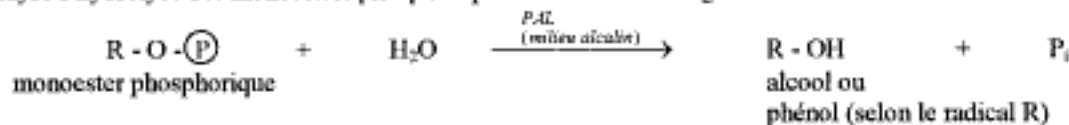
4. Calculer le rendement et l'enrichissement de la méthode. Conclure.

### Exercice 2 Purification de la phosphatase alcaline du lait

Le lait cru contient naturellement plusieurs types d'enzymes dont la phosphatase alcaline (PAL), qui est une enzyme soluble. Par contre, un lait correctement pasteurisé ne doit plus présenter d'activité enzymatique. La détermination de l'activité de la PAL constitue un moyen de contrôle du traitement thermique du lait.

La phosphatase alcaline du lait est une enzyme de structure dimérique, de masse moléculaire 170000 Da, de nature glyco-protéinique. Elle contient quatre atomes de zinc nécessaires à son activité. L'ion Mg<sup>2+</sup> est un activateur, la L-cystéine et les chélateurs de métaux sont des inhibiteurs. Son pH optimal d'action se situe vers 10.

Elle catalyse l'hydrolyse des monoesters phosphoriques selon la réaction générale suivante :



La phosphatase alcaline du lait est purifiée par une méthode qui comporte les deux étapes suivantes :

- étape 1 : le lait est amené à pH = 4,5 par addition de solution tampon, puis maintenu 1 heure à - 4°C. Il est centrifugé, le précipité obtenu est ensuite remis en solution dans l'eau distillée et on obtient la solution  $E_1$  ;
- étape 2 : la solution  $E_1$  est additionnée d'un même volume d'acétone, puis maintenue une nuit à - 4°C. Elle est centrifugée, le précipité obtenu est dissous dans une solution tampon. Après dialyse, contre de l'eau distillée, on obtient la solution  $E_2$ .

1. Donner le principe des opérations qui ont lieu dans les deux étapes de purification.

2. Pourquoi opérer à basse température ?

3. On se propose de déterminer l'activité du lait étudié et des solutions  $E_1$  et  $E_2$ . Les résultats expérimentaux sont reportés dans le tableau ci-dessous :

|                | Volume (mL) | CAC (UI.mL <sup>-1</sup> ) | Protéines ( $\rho$ en mg.mL <sup>-1</sup> ) |
|----------------|-------------|----------------------------|---------------------------------------------|
| Lait           | 6000        | 405                        | 14                                          |
| Solution $E_1$ | 2500        | 420                        | 6                                           |
| Solution $E_2$ | 60          | 11000                      | 12                                          |

3.1. Définir l'activité d'une préparation enzymatique. Préciser les conditions expérimentales nécessaires à cette mesure.

3.2. Définir la concentration d'activité catalytique (CAC) d'une préparation enzymatique.

3.3. Définir puis calculer :

- l'activité totale dans le lait et dans les solutions  $E_1$  et  $E_2$  ;
- l'activité spécifique dans le lait et dans les solutions  $E_1$  et  $E_2$ .

3.4. Calculer pour les solutions  $E_1$  et  $E_2$ , les enrichissements et rendements de purification. L'activité enzymatique du lait sera prise comme référence.

### Exercice 3 Purification de la LDH de foie de rat

On prépare un homogénat de foie de rat en broyant, à froid, du foie de rat fraîchement prélevé, mélangé à un tampon d'extraction. Après centrifugation, à + 4°C, on obtient 12 mL de surnageant. Ceci constitue l'extrait brut.

1. Dosage des protéines de l'extrait brut par la méthode de Bradford

Dans un tube à hémolyse, on introduit : 20  $\mu$ L d'extrait brut, 80  $\mu$ L d'eau distillée et 5 mL de réactif de Bradford.

Après homogénéisation, l'absorbance est lue à 465 nm contre un témoin réactif.

Sachant que la concentration en protéines de l'extrait brut est de  $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ , concevoir une gamme d'étalonnage pour ce dosage.

Donnée : la solution étalon de protéines a une concentration égale à  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ .

## 2. Mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut

Dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique, on introduit :

- 2,83 mL de tampon phosphate à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH = 7 ;
- 0,10 mL de solution de pyruvate de sodium à  $23 \text{ mmol.L}^{-1}$  ;
- 0,05 mL de solution de NADH à  $12 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

Après homogénéisation, la réaction est déclenchée par addition de :

- 20  $\mu\text{L}$  d'extrait brut.

L'évolution de la réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps.

La courbe  $A_{340} = f(t)$  est donnée ci-dessous.

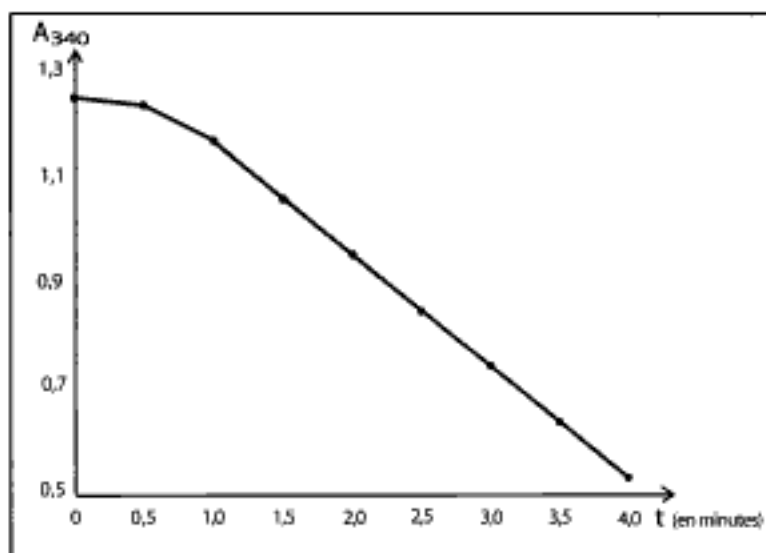
Sachant que les conditions habituelles de mesure d'une activité enzymatique sont respectées (voir résumé du cours), calculer la CAC de l'extrait brut en  $\text{nkatal.mL}^{-1}$  d'extrait brut.

Donnée :  $\epsilon_{340}$  de NADH est égal à  $6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

## 3. Purification de l'extrait brut

On purifie l'extrait brut par chromatographie d'exclusion-diffusion (gel-filtration). L'extrait purifié obtenu a un volume de 2 mL, une activité spécifique de  $820 \text{ nkat.mg}^{-1}$  et une CAC de  $360 \text{ nkat.mL}^{-1}$ .

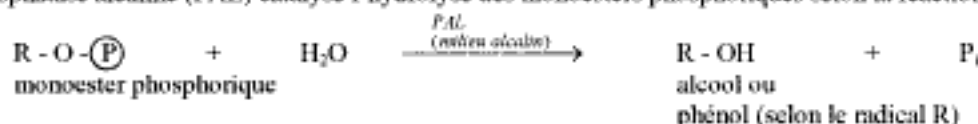
Calculer l'enrichissement et le rendement de l'opération de purification.



## Facteurs déterminant l'activité enzymatique ; équation de Michaelis - Menten ; paramètres cinétiques

### Exercice 4 Étude de la cinétique de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse des monoesters phosphoriques selon la réaction générale suivante :



Le substrat utilisé pour cette étude cinétique est le nitro-4-phénylphosphate de sodium. La réaction est suivie en dosant spectrophotométriquement le nitro-4-phénol libéré par hydrolyse du substrat. La vitesse initiale de la réaction est mesurée pour des concentrations différentes en substrat à  $+ 20^\circ\text{C}$  et à pH = 9,8. Trois essais sont réalisés : les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau ci-dessous (vitesses initiales données en unités arbitraires (u.a.) :

|                                         |                   |                   |                   |
|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| [Substrat]<br>(en $\text{mol.L}^{-1}$ ) | $2 \cdot 10^{-4}$ | $4 \cdot 10^{-4}$ | $1 \cdot 10^{-3}$ |
| Essai 1<br>(u.a.)                       | 0,178             | 0,278             | 0,416             |

## 1. Equation de Michaelis et Menten

- 1.1. Ecrire, sans la démontrer, l'équation de Michaelis et Menten.
- 1.2. Définir les grandeurs cinétiques  $K_M$  et  $V_{max}$ .
- 1.3. Donner la signification de la grandeur  $K_M$ .
- 1.4. A partir de l'équation de Michaelis et Menten, déduire l'équation dont la représentation graphique est du type  $1/v_i = f(1/[S])$ .

2. A partir des valeurs expérimentales ci-dessus, tracer, pour l'enzyme étudiée, la courbe  $1/v_i = f(1/[S])$  en l'absence d'effecteur. Déterminer les valeurs de  $K_M$  et  $V_{max}$ .

Que deviendraient  $K_M$  et  $V_{max}$  si l'on doublait la concentration en enzyme ?

Exercice 5 Etude d'une hexokinase de levure

L'hexokinase de levure catalyse la réaction suivante :



La réaction qui s'effectue en présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  est pratiquement irréversible.

Pour suivre l'évolution de la réaction, on utilise de l'ATP  $\gamma^{32}\text{P}$  (marqué par  $^{32}\text{P}$  sur le phosphate terminal). On mesure, après séparation, la radioactivité du glucose-6-phosphate formé à l'aide d'un compteur.

Le volume final de milieu réactionnel (MR) est de 1 mL et la cinétique correspond au modèle de Michaelis et Menten.

Le volume d'extrait enzymatique utilisé est de 0,1 mL.

La radioactivité spécifique de l'ATP est de 2000 coups par min et par nanomole ( $\text{cpm}\cdot\text{nmol}^{-1}$ ).

Les résultats expérimentaux sont les suivants :

| Temps en minutes                | 5    | 10   | 15   | 20   | 25   | 30   | 35   | 40   |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| cpm pour 40 $\mu\text{L}$ de MR | 1700 | 3400 | 5100 | 6700 | 7600 | 7800 | 7800 | 7800 |

1. Calculer la CAC de l'hexokinase en unités enzymatiques par mL d'extrait enzymatique ; l'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la fixation sur le glucose de 1 nmole de phosphate par minute dans les conditions de l'expérience.

2. Calculer l'activité spécifique de l'hexokinase, sachant que la quantité d'enzyme utilisée dans l'expérience est de 60  $\mu\text{g}$ .

3. La constante de Michaelis  $K_M$  de l'enzyme vis-à-vis du glucose est de  $8\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Montrer que le glucose est présent dans le milieu à une concentration suffisante pour déterminer valablement l'activité enzymatique.

(Il convient d'établir que la concentration en glucose dans le milieu réactionnel enzymatique est supérieure à  $10 \cdot K_M$ ).

Exercice 6 Cinétique de la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*

1. Le lactose et l'ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside (ONPG) sont deux substrats de cette enzyme. Donner les équations (formules développées des réactants y comprises) des réactions d'hydrolyse pour chacun des précédents substrats.

2. On se propose de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. A cet effet, on mesure les vitesses initiales d'hydrolyse de l'ONPG,  $\Delta A / \Delta t$ , à 373 nm, à  $+25^\circ\text{C}$ , dans 4 mélanges réactionnels réalisés dans des cuves de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique. A 373 nm, les  $\epsilon$  molaires sont de  $350 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour l'ONPG et  $2400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour l'ONP, produit d'hydrolyse de l'ONPG.

La composition des mélanges et les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

| Numéros des mélanges réactionnels                                                    | 1     | 2     | 3     | 4     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| ONPG à $1,2\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans un tampon pH = 7,6 (mL) | 2,5   | 1,0   | 0,50  | 0,30  |
| Tampon pH = 7,6 (mL)                                                                 | 0,4   | 1,9   | 2,4   | 2,6   |
| Enzyme à $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le tampon pH = 7,6 (mL)           | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   |
| $\Delta A / \Delta t$ ( $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$ )                             | 0,312 | 0,200 | 0,129 | 0,086 |

2.1. Démontrer que, dans les calculs des vitesses de disparition du substrat ou d'apparition du produit en fonction du temps à partir de  $\Delta A / \Delta t$ , il convient de tenir compte de la différence des deux  $\epsilon$  molaires donnés.

2.2. Déterminer la constante de Michaelis par la représentation graphique en double inverse.

2.3. Déduire de la représentation précédente l'activité spécifique de l'enzyme en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

2.4. La préparation enzymatique est constituée par de l'enzyme pure, calculer l'AMS ou AEM de l'enzyme en katal par mole d'enzyme. La masse molaire de l'enzyme est de  $540000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**Exercice 7** Cinétique de la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli* (variante)

Pour déterminer les paramètres cinétiques de cette enzyme, on mesure les vitesses initiales de l'hydrolyse de l'ONPG, à concentration variable, par l'enzyme présente dans le milieu réactionnel enzymatique à une concentration de  $1,54 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Pour chaque expérience, on détermine l'absorbance initiale, puis après démarrage de la réaction enzymatique le  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  et enfin l'absorbance finale après hydrolyse totale du substrat.

Toutes ces absorbances sont mesurées à 373 nm. Le coefficient d'absorption molaire du produit (ONP) à cette longueur d'onde est de  $2400 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . L'ONPG absorbe également à cette longueur d'onde, mais la connaissance de son  $\epsilon$  molaire n'est pas indispensable à la résolution de l'exercice proposé.

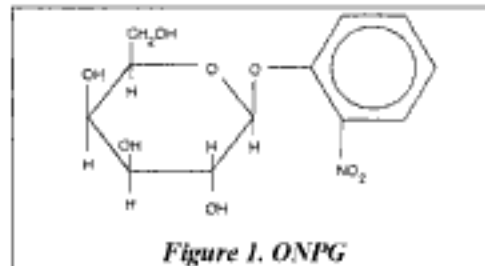
Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous :

| Absorbance initiale | $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ | Absorbance finale |
|---------------------|----------------------------------|-------------------|
| 0,350               | 0,312                            | 2,400             |
| 0,140               | 0,200                            | 0,960             |
| 0,070               | 0,129                            | 0,480             |
| 0,042               | 0,086                            | 0,288             |

Déterminer la constante de Michaelis, la vitesse maximale en  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ , ainsi que l'AEM en katal par mole d'enzyme.

**Facteurs déterminant l'activité enzymatique ; pH et température****Exercice 8** Etude de la cinétique de la  $\beta$ -galactosidase

1. La cinétique de la réaction catalysée par la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* est étudiée en utilisant l'ortho-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG), substrat synthétique, dont la formule est fournie sur la *figure 1*.



- Ecrire l'équation de la réaction (formules développées) en précisant le nom des substrats et produits.
- A quelle classe d'enzyme appartient la  $\beta$ -galactosidase ? Justifier la réponse.
- Préciser la spécificité de cette enzyme en comparant les structures des substrats naturel et synthétique.

2. La réaction d'hydrolyse est suivie en dosant l'ONP libéré au cours du temps par colorimétrie. Les résultats obtenus avec une prise d'essai de 0,2 mL d'extrait enzymatique E dans 1 mL de milieu réactionnel (concentration saturante en substrat, pH = 7 et température + 30°C) sont présentés dans la *figure 2*.

- Commenter l'allure de cette courbe.
- Définir puis déterminer graphiquement la vitesse initiale de la réaction dans les conditions de l'expérience.
- Calculer la concentration d'activité catalytique en  $\mu\text{kat}$  par mL d'extrait enzymatique.
- Sachant que l'extrait E utilisé contient 0,2 mg de protéines par mL, calculer l'activité spécifique en  $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

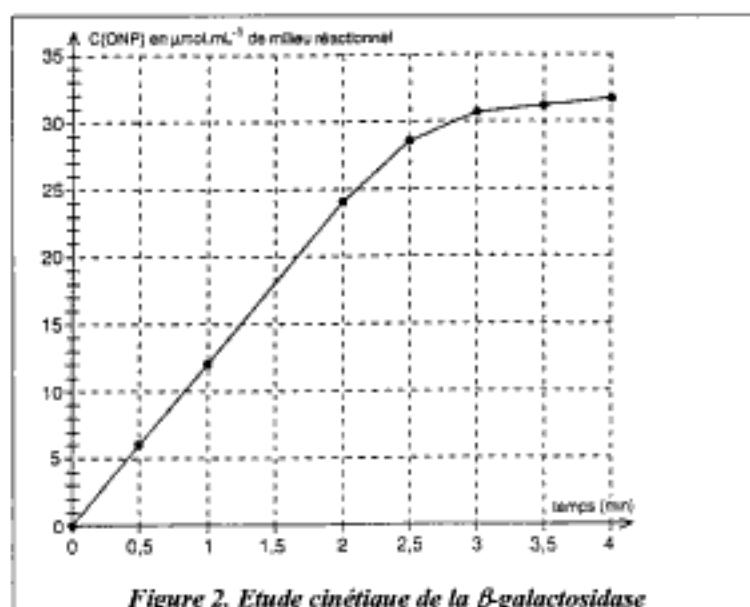
3. On peut trouver dans le commerce une préparation hautement purifiée de  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli*. Sur le catalogue du fournisseur, on peut lire les informations suivantes :

- $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* :  $11 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$  ;
- $K_M$  (ONPG) =  $0,110 \text{ mmol.L}^{-1}$  ;
- pH optimum = 6,6 à 7,4 ;
- température optimale : + 37°C.

Peut-on a priori purifier davantage l'extrait E ? Justifier la réponse.

4. Un technicien envisage de réaliser une série d'expériences notées A, B et C en utilisant le même volume d'extrait E et des conditions analogues à celles utilisées à la question 2.

- Expérience A : même concentration en substrat, même température, mais pH = 8.
- Expérience B : même concentration en substrat, même pH, mais température égale à + 37°C.
- Expérience C : même température, même pH, mais concentration en substrat dans le milieu réactionnel égale à  $0,110 \text{ mmol.L}^{-1}$ .



Tracer sur la *figure 2* l'allure probable des courbes obtenues pour chaque expérience A, B et C (justifier brièvement les réponses).  
Remarque : on admettra que la  $\beta$ -galactosidase a un comportement michaelien.

### Exercice 9 Etude de l'influence du pH sur la cinétique de la $\beta$ -fructosidase de levure

La  $\beta$ -fructosidase (E.C. 3.2.1.26), extraite essentiellement de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*), est une enzyme utilisée en industrie alimentaire pour la transformation du saccharose en un mélange équimolaire de glucose et de fructose, appelé sucre inverti. C'est une hydrolase capable de dégrader les liaisons  $\beta$ -fructofurannosiques, selon la réaction suivante :



Elle présente, pour le saccharose et à pH = 4,5, un  $K_M$  voisin de 30  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

#### 1. Etude de l'influence du pH sur la vitesse initiale maximale de réaction

On étudie l'influence du pH sur la vitesse initiale maximale de la réaction catalysée par la  $\beta$ -fructosidase. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| pH  | Vmax (UI) | pH   | Vmax (UI) |
|-----|-----------|------|-----------|
| 2,0 | 0,02      | 6,0  | 0,39      |
| 2,5 | 0,07      | 6,5  | 0,24      |
| 3,0 | 0,12      | 7,0  | 0,14      |
| 3,5 | 0,29      | 7,5  | 0,06      |
| 4,0 | 0,67      | 8,0  | 0,03      |
| 4,5 | 0,85      | 8,5  | 0,01      |
| 5,0 | 0,76      | 9,0  | 0,00      |
| 5,5 | 0,54      | 10,0 | 0,00      |

1.1. Tracer l'évolution de la Vmax en fonction du pH.

1.2. Déterminer le pH optimal de la réaction.

1.3. Relever la Vmax au pH optimal.

#### 2. Détermination des paramètres cinétiques de la $\beta$ -fructosidase à pH = 5,5

Les vitesses initiales de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat sont données dans le tableau ci-dessous :

| Saccharose ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) | Vitesse initiale (UI) |
|-------------------------------------|-----------------------|
| 12,0                                | 0,12                  |
| 24,0                                | 0,19                  |
| 48,0                                | 0,28                  |
| 72,0                                | 0,34                  |
| 96,0                                | 0,37                  |

2.1. Déterminer graphiquement les constantes cinétiques  $K_M$  et Vmax de la  $\beta$ -fructosidase à pH = 5,5.

2.2. Comparer l'activité et l'affinité de l'enzyme pour son substrat au pH optimal et à pH = 5,5.

2.3. Proposer, en vous aidant des données du cours de biochimie, une explication pour ces différences dans les valeurs des paramètres cinétiques entre le pH optimal et à pH = 5,5.

### Exercice 10 Etude de la ribonucléase (RNase) pancréatique

La RNase est une enzyme ayant l'ARN comme substrat, mais qui peut également agir vis à vis de nucléosides cycliques 2',3'-phosphate, ce qui peut faciliter son étude.

On se propose d'étudier l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme (activité exprimée en unités arbitraires (u.a.)).

Les résultats suivants sont obtenus :

|                             |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| pH                          | 3,0   | 3,5   | 4,0   | 4,5   | 5,0   | 5,5   | 6,0   | 6,5   |
| V <sub>max</sub><br>en u.a. | 0,000 | 0,010 | 0,025 | 0,060 | 0,160 | 0,375 | 0,600 | 0,780 |
| pH                          | 7,0   | 7,5   | 8,0   | 8,5   | 9,0   | 9,5   | 10,0  | 10,5  |
| V <sub>max</sub><br>en u.a. | 0,835 | 0,770 | 0,580 | 0,350 | 0,150 | 0,060 | 0,025 | 0,010 |

1. Représenter la courbe V<sub>max</sub> = f (pH). Commenter l'allure obtenue et en déduire le pH optimal d'activité.

2. Le site actif de l'enzyme comporte une histidine déprotonée en position 12 et une histidine protonnée en position 119, la lysine en position 41 contribuant à maintenir le substrat par le biais de sa charge cationique. Le mécanisme réactionnel est de type acide-base. En utilisant la représentation de Dixon (voir résumé du cours), discuter de la compatibilité des résultats expérimentaux avec le mécanisme réactionnel exposé ci-dessus.

### Exercice 11 Activation thermique de la β-galactosidase

On se propose de déterminer l'énergie d'activation (E<sub>A</sub>) de la β-galactosidase. A cet effet, on mesure les vitesses initiales d'hydrolyse de l'ortho-nitrophényl-β-galactoside (ONPG) à 405 nm (ΔA / 5 min) à différentes températures non dénaturantes, après avoir réalisé l'équilibre thermique de tous les réactants. Les résultats suivants sont obtenus :

|                                  |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Température (°C)                 | + 25  | + 27  | + 30  | + 33  | + 35  | + 37  |
| Vitesse initiale<br>(ΔA / 5 min) | 0,305 | 0,330 | 0,370 | 0,414 | 0,446 | 0,480 |

A partir de l'équation de l'activation thermique (voir résumé du cours) et en utilisant une représentation graphique appropriée, déterminer l'énergie d'activation de l'enzyme.

### Exercice 12 Stabilité thermique de la thrombine

La thrombine possède une activité protéasique. Celle-ci peut être étudiée en utilisant un substrat synthétique dit EtM-SPro-Arg-pNA. L'hydrolyse par la thrombine du substrat synthétique libère du pNA (4-nitroamylide) qui absorbe fortement à 405 nm.

La solution de thrombine (100 μL à chaque fois) est préalablement exposée à + 37°C pendant 0, 30, 60, 90 et 120 minutes. Les temps d'exposition exactement écoulés, les différents échantillons de thrombine sont placés dans la glace avant étude de l'activité enzymatique résiduelle.

L'étude de l'activité résiduelle s'effectue à partir de 20 μL des différentes solutions de thrombine dans les conditions standard. Dans le tableau des résultats obtenus, les tubes sont notés D<sub>x</sub>, x étant le temps exact d'exposition préalable à 37°C exprimé en minutes.

|                                        |                |                 |                 |                 |                  |
|----------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Numéro des tubes                       | D <sub>0</sub> | D <sub>30</sub> | D <sub>60</sub> | D <sub>90</sub> | D <sub>120</sub> |
| Valeur de ΔA / Δt (min <sup>-1</sup> ) | 0,615          | 0,581           | 0,532           | 0,491           | 0,459            |

1. Les cinétiques de dénaturation par des températures peu élevées étant, en général, des cinétiques d'ordre 1, proposer une représentation graphique judicieuse pour étudier le phénomène de stabilité thermique. A partir des résultats expérimentaux obtenus, vérifier la pertinence de ce modèle cinétique.

2. Préciser la valeur de la constante de vitesse de dénaturation de la thrombine à + 37°C en min<sup>-1</sup>, donner la demi-vie de la thrombine à + 37°C.

## Facteurs déterminant l'activité enzymatique ; effecteurs michaeliens

### Exercice 13 Etude de la glucose-6-phosphate déshydrogénase

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (E.C.1.1.1.49) de *Saccharomyces pombe* intervient dans la première étape du cycle des pentoses - phosphates (voie de Dickens - Horecker) et catalyse la transformation du glucose-6-phosphate en acide-6-phosphogluconique. L'étude portera sur l'influence de la concentration en substrat et sur l'influence de deux effecteurs sur la cinétique enzymatique.

1. Les résultats de l'étude de l'influence de la concentration en substrat sur la cinétique enzymatique sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Glucose-6-phosphate<br>(mmol.L <sup>-1</sup> ) | Vitesse initiale<br>(U.L.mL <sup>-1</sup> d'enzyme) |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0,60                                           | 22,2                                                |
| 1,20                                           | 30,8                                                |
| 2,40                                           | 38,1                                                |
| 4,80                                           | 43,2                                                |
| 9,60                                           | 46,4                                                |

1.1. Définir les paramètres cinétiques  $K_M$  et  $V_{max}$ .

1.2. Déterminer graphiquement ces paramètres.

2. Les deux effecteurs étudiés sont : le glycéraldéhyde-3-phosphate et le ribulose-5-phosphate, produits intermédiaires de la voie des pentoses - phosphates. Les résultats de l'étude de l'influence de ces deux effecteurs sur la cinétique enzymatique sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Glucose-6-phosphate<br>(mmol.L <sup>-1</sup> ) | Glycéraldéhyde-3-phosphate<br>(0,5 mmol.L <sup>-1</sup> ) | Ribulose-5-phosphate<br>(0,5 mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                                | Vitesse initiale<br>(U.L.mL <sup>-1</sup> d'enzyme)       | Vitesse initiale<br>(U.L.mL <sup>-1</sup> d'enzyme) |
| 0,60                                           | 9,70                                                      | 4,90                                                |
| 1,20                                           | 16,2                                                      | 9,00                                                |
| 2,40                                           | 24,5                                                      | 15,2                                                |
| 4,80                                           | 32,9                                                      | 23,3                                                |
| 9,60                                           | 39,7                                                      | 31,8                                                |

2.1. Préciser le rôle des effecteurs étudiés. Justifier la réponse.

2.2. Nommer l'effecteur ayant la plus grande efficacité. Justifier la réponse.

### Exercice 14 Relations enzyme-substrat et enzyme-inhibiteurs

Un biochimiste veut caractériser une enzyme qu'il vient de purifier. Pour cela, il réalise une série d'expériences au cours desquelles il détermine la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat et en présence d'un inhibiteur X à la concentration de  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> d'une part, d'un inhibiteur Y à la même concentration d'autre part.

Pour chaque expérience, il utilise 10  $\mu$ L de solution enzymatique à 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Les vitesses sont exprimées, par minute, en  $\mu$ moles de substrat transformé dans ces conditions expérimentales.

| [S] en mol.L <sup>-1</sup> | $50 \cdot 10^{-5}$ | $20 \cdot 10^{-5}$ | $10 \cdot 10^{-5}$ | $7,0 \cdot 10^{-5}$ | $5,0 \cdot 10^{-5}$ |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| $v_i$ en présence de X     | 10,9               | 7,13               | 4,59               | 3,52                | 2,65                |
| $v_i$ en présence de Y     | 12,5               | 7,13               | 4,16               | 3,09                | 2,29                |

Le biochimiste sait que l'enzyme pure cristallisée a les caractéristiques suivantes :

- masse molaire moléculaire de 125000 g.mol<sup>-1</sup> ;
- AEM de 175000 mol S.min<sup>-1</sup>.(mol E)<sup>-1</sup>.

Tirer partie des données et des résultats expérimentaux ci-dessus pour déterminer le maximum de caractéristiques concernant l'enzyme et ses relations avec son substrat et ses inhibiteurs.

Donnée : on sait que l'un des inhibiteurs est compétitif et l'autre non compétitif.



## Cinétiques à deux substrats

### Exercice 15 Etude cinétique de la glutamate déshydrogénase

On désire déterminer les constantes cinétiques ( $K_M$  et  $V_{max}$ ) de la glutamate déshydrogénase vis-à-vis de ses deux substrats : l'acide glutamique et le NAD oxydé. L'expérience est conduite à une température de + 25°C et au pH optimal d'action de l'enzyme.

#### 1. Résultats expérimentaux

- Première série de mesures :

- le NAD oxydé est introduit en concentration constante et saturante dans le milieu réactionnel ;
- la concentration en acide glutamique varie.

Les résultats expérimentaux obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

| Acide glutamique<br>(mmol.L <sup>-1</sup> ) | Vitesse initiale<br>(Unités arbitraires) |
|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| 0,15                                        | 0,63                                     |
| 0,30                                        | 1,09                                     |
| 0,60                                        | 1,71                                     |
| 1,20                                        | 2,40                                     |
| 2,40                                        | 3,00                                     |

- Deuxième série de mesures :

- l'acide glutamique est introduit en concentration constante et saturante dans le milieu réactionnel ;
- la concentration en NAD oxydé varie.

Les résultats expérimentaux obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

| NAD oxydé<br>(mmol.L <sup>-1</sup> ) | Vitesse initiale<br>(Unités arbitraires) |
|--------------------------------------|------------------------------------------|
| 0,01                                 | 0,42                                     |
| 0,02                                 | 0,71                                     |
| 0,04                                 | 1,11                                     |
| 0,08                                 | 1,54                                     |
| 0,16                                 | 1,90                                     |

#### 2. Exploitation des résultats

- 2.1. Justifier les conditions expérimentales proposées pour les deux séries de mesures.
- 2.2. Ecrire, sans la démontrer, l'équation de Michaelis et Menten.
- 2.3. Donner la signification des grandeurs cinétiques  $K_M$  et  $V_{max}$ .
- 2.4. Utiliser la représentation de Lineweaver et Burk pour déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme vis-à-vis de ses deux substrats. Représenter les deux séries de mesures sur des graphiques séparés.

#### 3. Représentations graphiques théoriques de l'influence de deux effecteurs sur la cinétique enzymatique

3.1. Sur la représentation graphique de Lineweaver et Burk, pour la première série de mesures, tracer l'allure théorique des courbes que l'on obtiendrait :

- en présence d'un inhibiteur compétitif de la glutamate déshydrogénase (justifier le tracé) ;
- en présence d'un inhibiteur non compétitif de la glutamate déshydrogénase (justifier le tracé).

3.2. Représenter, pour la première série de mesures, la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat (courbe de Michaelis et Menten) et tracer l'allure théorique des courbes que l'on obtiendrait :

- en présence d'un inhibiteur compétitif de la glutamate déshydrogénase ;
- en présence d'un inhibiteur non compétitif de la glutamate déshydrogénase.

### Exercice 16 Créatine kinase (CK)

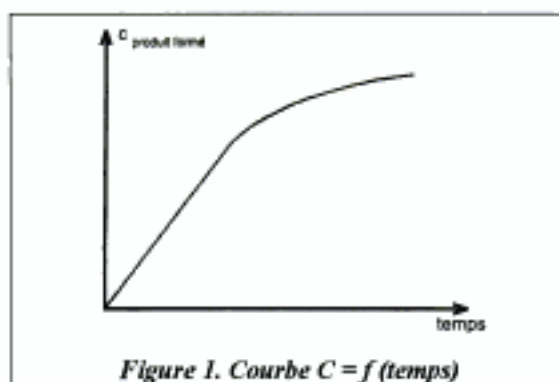
La créatine kinase (E.C.2.7.3.2) catalyse la phosphorylation de la créatine par l'ATP selon la réaction :



1. A quelle classe d'enzymes appartient la créatine kinase ? Justifier la réponse.

2. Pour étudier la vitesse de la réaction catalysée par la CK, on suit l'apparition du produit en fonction du temps dans le milieu réactionnel.

On obtient la courbe reproduite sur la *figure 1*.

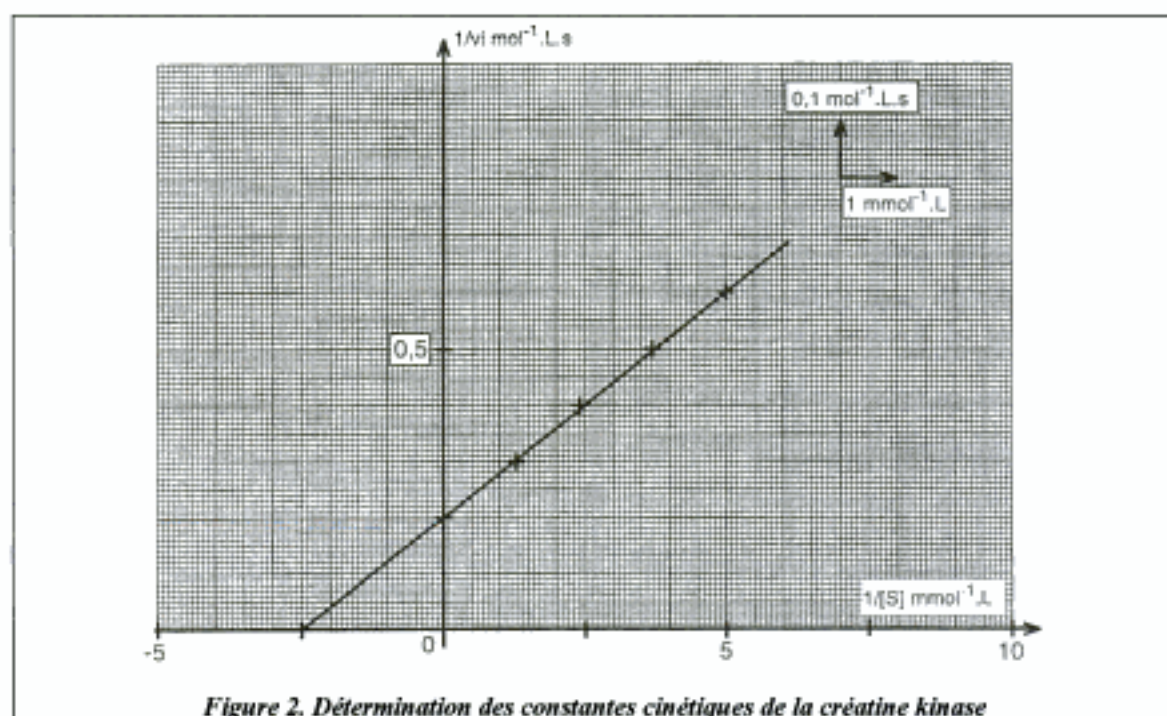


2.1. Commenter l'allure de la courbe en précisant la zone utilisable pour déterminer la vitesse initiale.

2.2. Expliquer comment déterminer graphiquement cette vitesse initiale.

### 3. Détermination des constantes cinétiques de la créatine kinase

La phosphorylation de la créatine dépend de la concentration en créatine et en ATP. On mesure la vitesse initiale de cette réaction en fonction de concentrations croissantes en ATP, la concentration en créatine étant constante et saturante. La *figure 2* montre les résultats obtenus.



3.1. Déterminer graphiquement les constantes cinétiques de la CK.

3.2. On recommence l'expérience ci-dessus mais en faisant varier la concentration en créatine, celle en ATP restant constante et saturante. On obtient un  $K_M$  (de la CK pour la créatine) égal à  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Que peut-on en conclure ?

3.3. Quelle serait l'influence de la modification du pH du milieu réactionnel sur les constantes cinétiques ? Justifier la réponse.

### 4. Les isoenzymes de la créatine kinase

La CK est une enzyme dimérique formée de deux sous unités polypeptidiques M (muscle) et B (brain).

4.1. Donner la définition des isoenzymes.

4.2. Quelles sont les structures possibles de la CK ?

## Exercice 17 Etude de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



Dans la suite de l'exercice, et conformément à la notation de Cleland, l'oxaloacétate sera dénommé B et le glutamate A.

1. Il s'agit d'une réaction enzymatique à deux substrats de type "Bi-Bi ping-pong".

1.1. Ecrire le modèle cinétique de la réaction en utilisant la notation de Cleland.

1.2. L'équation des vitesses dans ce cas s'écrit :

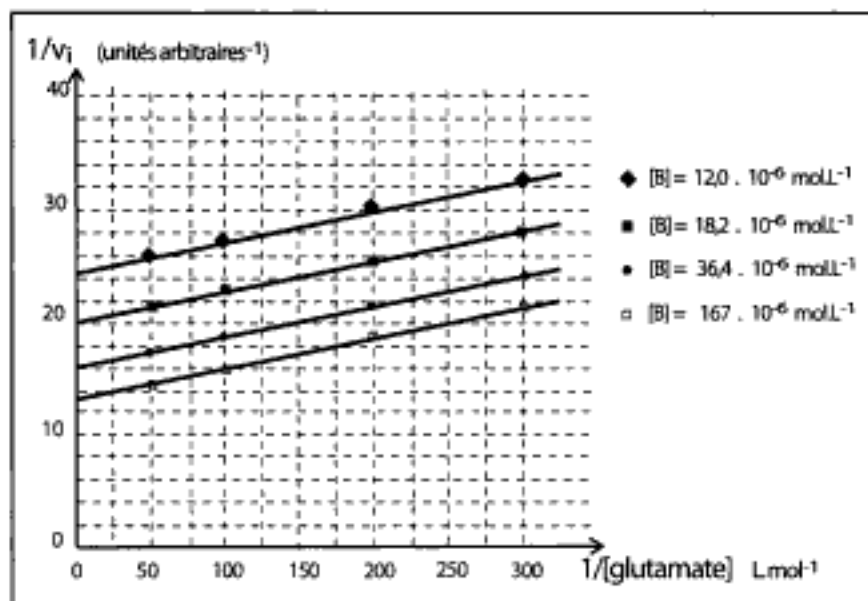
$$v_i = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}}$$

$K_A$  et  $K_B$  sont les constantes de Michaelis de l'enzyme pour A et pour B, [A] et [B] sont les concentrations en A et en B.

Que devient l'équation des vitesses quand A est en large excès ?

2. A partir de la représentation graphique donnée, et par une représentation graphique secondaire utilisant les résultats obtenus quand A est en large excès, déterminer  $K_B$  pour B, ainsi que la vitesse maximale.

Déterminer également  $K_A$ .



### Exercice 18 Mécanisme enzymatique d'une nucléoside-diphosphate kinase (NDP-kinase)

L'enzyme considérée catalyse la réaction suivante :



La formation d'UTP est importante au niveau de la cellule animale pour obtenir les formes actives des oses, comme l'UDG-galactose ou l'UDP-glucose.

1. La réaction est étudiée dans le sens  $\text{ATP} + \text{UDP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{UTP}$ . On mesure la  $v_i$  en fonction de la concentration en ATP en présence de différentes concentrations en UDP, puis la  $v_i$  en fonction de la concentration en UDP en présence de différentes concentrations en ATP. Les résultats obtenus sont représentés, respectivement, sur les figures 1 et 2.

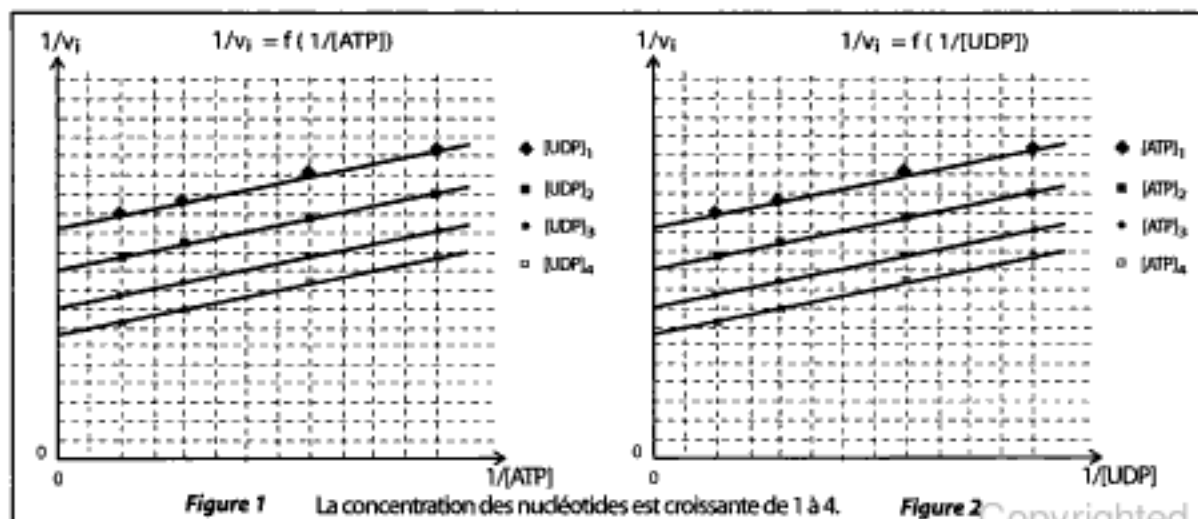
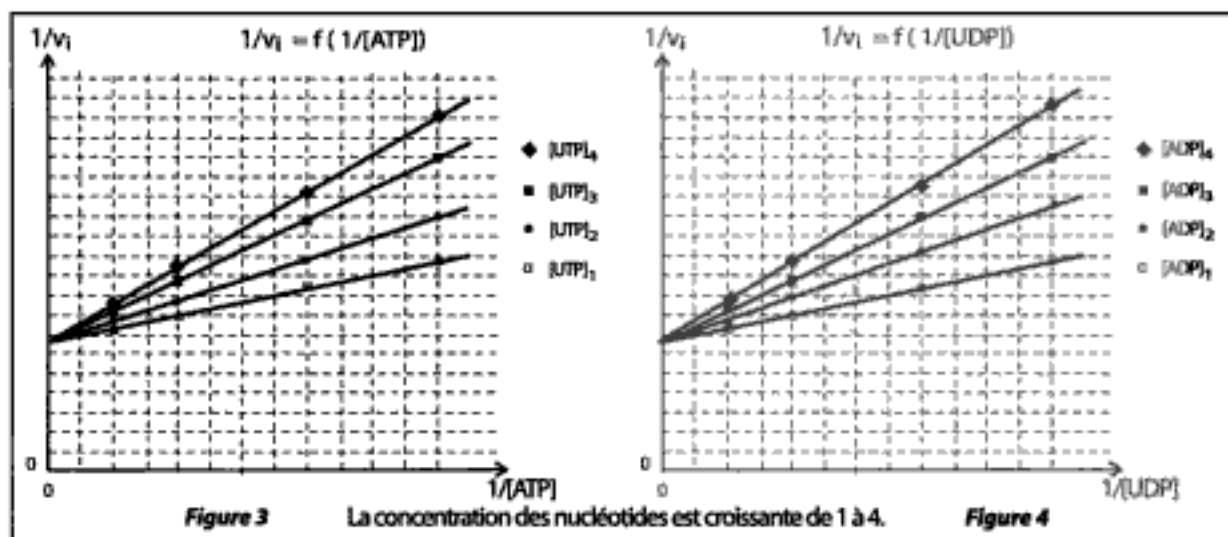


Figure 1 La concentration des nucléotides est croissante de 1 à 4.

Figure 2

Proposer un mécanisme de fonctionnement compatible avec ces résultats et en donner son écriture en représentation de Cleland.

2. Une nouvelle étude est effectuée pour étudier l'influence de la présence des produits de la réaction, l'ADP et l'UTP, sur cette même réaction. On mesure la  $v_i$  en fonction de la concentration en ATP en présence de différentes concentrations en UTP, puis la  $v_i$  en fonction de la concentration en UDP en présence de différentes concentrations en ADP. Les résultats obtenus sont représentés, respectivement, sur les figures 3 et 4.



Commenter les résultats obtenus et proposer un mécanisme de fonctionnement de l'enzyme compatible avec l'ensemble des résultats.

#### Exercice 19 Etude d'une enzyme à NAD

L'enzyme étudiée fait partie des déshydrogénases et catalyse la réaction :



Au niveau de cette réaction, le  $\text{NAD}^+$  est considéré comme un substrat de l'enzyme.

On se propose de déterminer le mécanisme de la réaction à 2 substrats et 2 produits (Bi-Bi), ainsi que les paramètres cinétiques dans des conditions où ni l'un, ni l'autre des substrats n'est présent à concentration saturante.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant ; les vitesses initiales sont exprimées en unités arbitraires (u.a).

| [NAD <sup>+</sup> ] en mol.L <sup>-1</sup> | [S] en mol.L <sup>-1</sup> |                     |                     |
|--------------------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
|                                            | 4.0.10 <sup>-5</sup>       | 10.10 <sup>-5</sup> | 20.10 <sup>-5</sup> |
| 0.5.10 <sup>-4</sup>                       | 0,251                      | 0,483               | 0,699               |
| 1,0.10 <sup>-4</sup>                       | 0,320                      | 0,582               | 0,802               |
| 5,0.10 <sup>-4</sup>                       | 0,399                      | 0,685               | 0,900               |

1. A l'aide de représentations graphiques adéquates, proposer le mécanisme Bi-Bi le plus approprié aux résultats obtenus. En donner la représentation de Cleland (voir également le résumé du cours).

2. A l'aide d'une représentation graphique secondaire, déterminer le  $K_S$  ou constante de dissociation de l'enzyme pour le substrat S, ainsi que la  $V_{\text{max}}$ .

3. Sur les représentations graphiques effectuées pour la question 1, préciser les coordonnées des points d'intersection des faisceaux de droites obtenus. En déduire les valeurs de  $V_{\text{max}}$  et  $K_{\text{NAD}}$  (constante de dissociation de l'enzyme pour le  $\text{NAD}^+$ ). Comparer les valeurs obtenues pour la  $V_{\text{max}}$  avec celle obtenue à la question 2.

Donnée : dans ce cas de figure, l'équation de la vitesse est :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\text{max}}} \cdot \left( 1 + \frac{K_S}{[S]} + \frac{K_{\text{NAD}^+}}{[\text{NAD}^+]} \cdot \frac{K_S}{[S]} \right) = \frac{1}{V_{\text{max}}} \cdot \left( 1 + \frac{K_{\text{NAD}^+}}{[\text{NAD}^+]} \right) \cdot \frac{K_S}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

4. Quel peut être l'intérêt biologique de ce mécanisme impliquant le  $\text{NAD}^+$  dans le cas de pénurie relative de l'un ou l'autre substrat ?

### Cinétiques à deux substrats et allostérie

#### Exercice 20 Étude de l'aspartokinase I d'*Escherichia coli*

L'acide aspartique est un acide aminé à l'origine de la biosynthèse de 4 autres acides aminés chez *E. coli* : la lysine, la méthionine, la thréonine et l'isoleucine.

L'aspartokinase I (sous forme de complexe multienzymatique) intervient au cours de la première étape de cette biosynthèse. Dans certaines conditions, sa cinétique peut être michaelienne. Son activité est régulée par quelques effecteurs, notamment la thréonine.

Le tableau suivant donne les mesures de la vitesse initiale (en unités arbitraires) obtenues en l'absence et en présence de thréonine à une concentration de  $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

| [S]<br>en $\text{mol.L}^{-1}$ | 0,0   | $1,0 \cdot 10^{-3}$ | $2,5 \cdot 10^{-3}$ | $5,0 \cdot 10^{-3}$ | $7,5 \cdot 10^{-3}$ | $10 \cdot 10^{-3}$ | $15 \cdot 10^{-3}$ | $20 \cdot 10^{-3}$ | $25 \cdot 10^{-3}$ |
|-------------------------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| $v_i$<br>sans thréonine       | 0,000 | 0,343               | 0,567               | 0,727               | 0,800               | 0,843              | 0,890              | 0,917              | 0,933              |
| $v_i$<br>avec thréonine       | 0,000 | 0,000               | 0,015               | 0,122               | 0,331               | 0,549              | 0,813              | 0,915              | 0,956              |

1. Représenter les courbes  $v_i = f([S])$  en l'absence et en présence de thréonine. Conclure.
2. Effectuer la représentation en double inverse en l'absence de thréonine. En déduire la valeur de la constante de Michaelis et celle de la vitesse initiale maximale.
3. Effectuer la représentation de Hill (voir résumé du cours) en l'absence et en présence de thréonine. En déduire la valeur de la constante de Michaelis (à comparer avec celle obtenue à la question 2), ainsi que l'indice de coopérativité en présence de thréonine.

### Détermination d'activités enzymatiques et dosage de substrats

#### Exercice 21 Détermination de $\Gamma_{\epsilon_{405}}$ du para-nitrophénol

La phosphatase alcaline catalyse la réaction suivante :



La catalyse enzymatique peut être suivie directement à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté en relevant la variation d'absorbance en fonction du temps dans les conditions initiales.

Le mode opératoire est le suivant : dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique thermostatée à  $+25^\circ\text{C}$ , on introduit 3 mL d'un mélange réactionnel préalablement porté à  $+25^\circ\text{C}$  et 0,05 mL d'échantillon de phosphatase alcaline à tester également porté à  $+25^\circ\text{C}$ . On note l'absorbance à 405 nm après 1, 2 et 3 minutes.

1. Donner la composition qualitative du mélange réactionnel.
2. La CAC de l'enzyme exprimée en  $\text{U.L}^{-1}$  étant donnée par la relation  $\text{CAC} = 3300 \cdot (\Delta A \cdot \text{min}^{-1})$ , en déduire  $\Gamma_{\epsilon_{405}}$  du PNP en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , puis en  $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ .

#### Exercice 22 Détermination de $\Gamma_{\epsilon_{340}}$ de NADH

Pour déterminer  $\Gamma_{\epsilon_{340}}$  de NADH, on procède à l'expérience suivante : dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique, on introduit 1,5 mL de mélange réactionnel (NADH, LDH, tampon) ; l'absorbance à 340 nm est alors de 0,625.

On ajoute alors 1 mL de pyruvate à une concentration de  $73,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ . Après réaction, la nouvelle absorbance toujours à 340 nm est de 0,190.

La réaction est effectuée dans des conditions où la quantité de NADH transformé est égale à la quantité de pyruvate ajouté.

Calculer  $\Gamma_{\epsilon_{340}}$  de NADH.

**Exercice 23 Etude d'une préparation de LDH**

1. Une préparation de LDH est utilisée dans l'expérience suivante. On réalise une série de 3 essais dont la préparation est décrite ci-dessous :

| Essai                             | 1     | 2     | 3     |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| H <sub>2</sub> O (mL)             | 2     | /     | /     |
| Solution étalon de protéines (mL) | /     | 2     | /     |
| Préparation de LDH (mL)           | /     | /     | 2     |
| Réactif du biuret (mL)            | 8     | 8     | 8     |
| Absorbance mesurée après 30 min   | 0,050 | 0,250 | 0,290 |

Concentration de la solution étalon de protéines : 1 mg. mL<sup>-1</sup> Trajet optique : 1 cm.

Quelle est la concentration en protéines dans la préparation de LDH ?

2. La LDH catalyse la réaction :



Dans la cuve d'un spectrophotomètre, on introduit 2,95 mL d'un tampon adéquat contenant du pyruvate et du NADH en concentrations saturantes. On ajoute 50 µL de la préparation de LDH précédemment utilisée. Comment varie l'absorbance à 340 nm ? Justifier la réponse.

3. On suit la variation d'absorbance à 340 nm en fonction du temps ; celle-ci est égale à 0,048 UA. min<sup>-1</sup> (unité d'absorbance . min<sup>-1</sup>). Le coefficient d'absorption molaire de NADH est de 6300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 340 nm.

3.1. Donner la définition du coefficient d'absorption molaire et sa relation avec l'absorbance.

3.2. Calculer la quantité de NADH transformée en 1 min dans la cuve de lecture.

3.3. Calculer l'activité spécifique de la préparation de LDH.

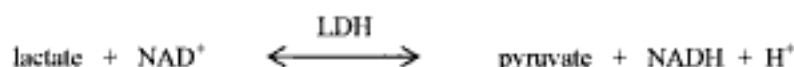
**Exercice 24 La lactate déshydrogénase (LDH) au laboratoire de biochimie**

Au laboratoire de biochimie, la réaction catalysée par la lactate déshydrogénase peut être mise à profit : soit pour déterminer l'activité de l'enzyme, soit pour doser l'acide lactique.

1. Détermination de l'activité de la lactate déshydrogénase

Pour déterminer l'activité de la LDH on opère selon le protocole suivant :

Réaction :



Mode opératoire :

introduire successivement dans une cuve de trajet optique égal à 1 cm :

- solution de pyruvate tamponnée à pH = 7, préalablement portée à + 25°C..... 3 mL
- solution de NADH..... 0,05 mL
- échantillon à analyser..... 0,1 mL

La cuve est maintenue à + 25°C pendant toute la durée de l'expérience. On mesure l'absorbance de la solution à 340 nm contre l'air, toutes les minutes pendant 4 min.

Les résultats des mesures d'absorbance en fonction du temps sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Temps (min)             | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance (λ = 340 nm) | 0,378 | 0,363 | 0,347 | 0,332 | 0,317 |

1.1. Tracer et interpréter l'allure de la courbe représentant l'absorbance en fonction du temps.

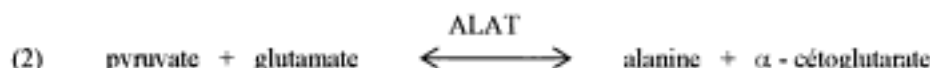
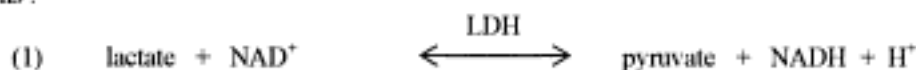
1.2. Comment évoluerait la réaction au cours du temps si l'on continuait l'expérience ? Justifier la réponse.

1.3. Déterminer l'activité de la LDH. Exprimer les résultats en UI par mL, d'échantillon à analyser et en kat par L d'échantillon à analyser.

2. Dosage enzymatique de l'acide lactique

La lactate déshydrogénase catalyse la déshydrogénation de l'acide lactique en acide pyruvique. Pour déterminer la concentration en acide lactique d'un échantillon, on procède par spectrophotométrie UV à 340 nm en présence de lactate déshydrogénase, selon le protocole suivant :

Réactions :



Réactifs :

- solution 1 : tampon glycyl - glycine pH = 10,0, acide glutamique (à 45 mmol.L<sup>-1</sup> dans le milieu réactionnel), stabilisateurs ;
- solution 2 : lyophilisat de NAD<sup>+</sup> repris extemporanément avec 6 mL d'eau distillée ;
- suspension 3 : alanine amino transférase (ALAT) ;
- solution 4 : lactate déshydrogénase (LDH).

Mode opératoire :

- $\lambda = 340 \text{ nm}$  ;
- $l = 1 \text{ cm}$  ;
- $\theta = + 25^\circ\text{C}$  ;
- limite de linéarité : 0,2 mmol d'acide lactique par litre de milieu réactionnel.

|                                                                       | Témoin           | Essai            |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Solution 1                                                            | 1,0 mL           | 1,0 mL           |
| Solution 2                                                            | 0,2 mL           | 0,2 mL           |
| Eau distillée                                                         | 1,0 mL           | 0,9 mL           |
| Suspension 3                                                          | 0,02 mL          | 0,02 mL          |
| Solution à doser diluée au 1/100                                      |                  | 0,1 mL           |
| Mélanger et lire, après 2 min, les absorbances contre l'eau distillée |                  |                  |
|                                                                       | $A_{1T} = 0,150$ | $A_{2E} = 0,146$ |
| Déclencher la réaction par la solution 4                              | 0,02 mL          | 0,02 mL          |
| Mélanger et lire les absorbances après 10 min.                        |                  |                  |
|                                                                       | $A_{2T} = 0,213$ | $A_{2E} = 0,539$ |

- 2.1. A quelle technique fait appel ce dosage ?
- 2.2. Quel est le rôle de la réaction (2) dans ce principe ?
- 2.3. Expliquer le sens de variation de l'absorbance et l'intérêt de mesurer  $A_{1T}$  et  $A_{2T}$ .
- 2.4. La concentration massique en acide lactique est donnée par la formule :

$$\rho \text{ (en g.L}^{-1}\text{)} = \Delta A \times K \quad \text{avec} \quad \Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$$

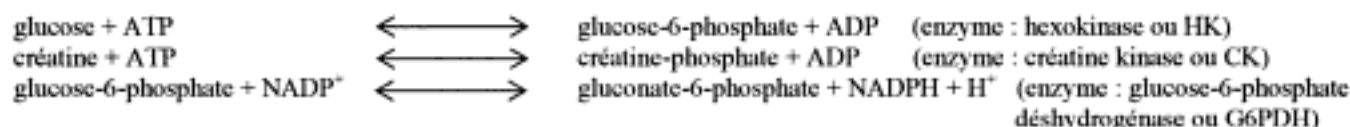
Etablir la formule littérale complète permettant de calculer K, puis calculer la concentration en acide lactique exprimée en grammes par litre d'échantillon.

Données :

- NADH :  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  ;
- masse molaire de l'acide lactique = 90,1 g.mol<sup>-1</sup>.

**Exercice 25** Détermination de la CAC de la créatine kinase (CK)

Le principe de cette détermination est fondé sur l'utilisation de réactions dont les équations sont les suivantes :



N.B. Les réactions sont données dans un ordre et un sens quelconques.

Le mode opératoire est le suivant :

dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique, on introduit 2,5 mL de milieu réactionnel et 0,1 mL d'échantillon de CK à tester. L'équilibre thermique a été préalablement réalisé à + 30°C et est maintenu à + 30°C pendant toute la durée de l'expérience. Au bout de 5 minutes, on note une variation d'absorbance de 0,1 à 340 nm.

1. Mettre les réactions ci-dessus dans un ordre et un sens compatibles avec la détermination réalisée.
2. Que peut-on dire des cinétiques des réactions catalysées par les enzymes HK, CK et G6PDH ?
3. Donner la composition qualitative du mélange réactionnel.

4. Calculer la CAC de l'échantillon de CK à tester en  $U.LL^{-1}$  ainsi qu'en  $kat.L^{-1}$ .

Donnée :  $\epsilon_{340} \text{ NADPH} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

**Exercice 26** Dosage d'un mélange de glucose-1-phosphate et de glucose-6-phosphate

Dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique, on introduit 1 mL du mélange à doser et 1,5 mL d'un réactif renfermant un excès de  $\text{NADP}^+$ , de  $\text{MgCl}_2$  et de glucose-6-phosphate déshydrogénase. L'absorbance lue à 340 nm, initialement égale à 0, augmente de 0,470.

On ajoute alors 1,5 mL d'une solution de phosphoglucomutase et l'absorbance augmente jusqu'à 0,600.

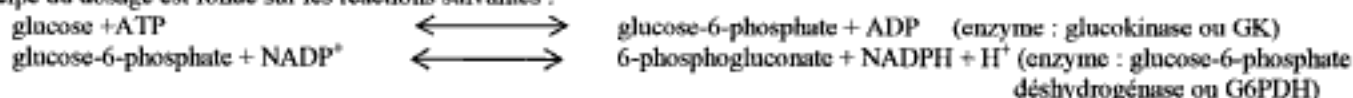
1. Ecrire les équations catalysées par les enzymes utilisées et en déduire le principe du dosage effectué.

2. Calculer les concentrations en glucose-1-phosphate et glucose-6-phosphate dans le mélange.

Donnée :  $\epsilon_{340} \text{ de NADPH} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

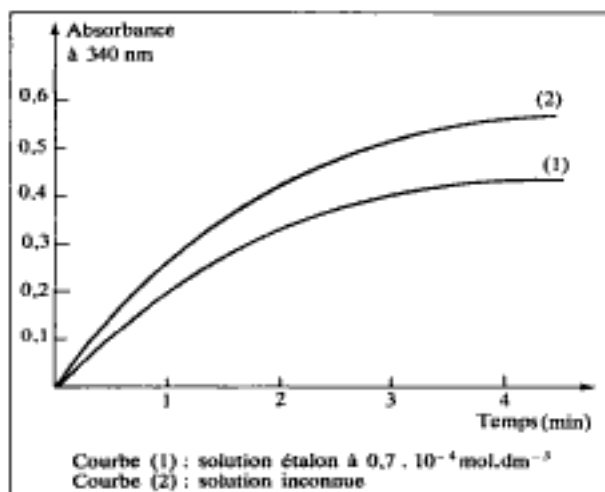
**Exercice 27** Utilisation de la glucokinase pour le dosage du glucose

Le principe du dosage est fondé sur les réactions suivantes :



Calculer les concentrations en glucose de la solution inconnue dans le milieu réactionnel enzymatique et comparer les résultats obtenus par les différentes méthodes de dosage des substrats : point final, cinétique en vitesse initiale et cinétique non linéaire en temps fixé.

On dispose pour ce faire des enregistrements ci-joints. Pour ce qui concerne la méthode en point final, l'absorbance en fin de réaction est de 0,570.



Données :

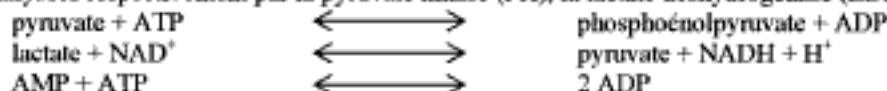
-  $\epsilon_{340} \text{ de NADPH} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  et trajet optique de la cuve utilisée = 1 cm ;

- la concentration de la solution étalon donnée ci-dessus est la concentration en glucose dans le milieu réactionnel enzymatique.

**Exercice 28** Dosages de l'AMP et de l'ADP dans le sang total

Ces deux nucléotides sont présents dans le sang à des concentrations comprises usuellement entre  $49,1$  et  $112,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  pour l'ADP et entre  $14,4$  et  $34,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$  pour l'AMP.

Les dosages sont des techniques en point final et font intervenir trois réactions enzymatiques (présentées ici dans un ordre et un sens quelconques) catalysées respectivement par la pyruvate kinase (PK), la lactate déshydrogénase (LDH) et la myokinase (MK) :



Le mode opératoire adopté est le suivant :

- dans un tube à centrifuger, introduire 5 mL de sang et 5 mL d'acide perchlorique à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Séparer le surnageant et le précipité après centrifugation et introduire 5 mL de surnageant et 1 mL de tampon dans un tube à essais ; filtrer ;

- dans une cuve de spectrophotométrie de 1 cm de trajet optique, introduire 2 mL de filtrat, 0,4 mL de mélange réactif et 0,02 mL de suspension de LDH ; après mélange, lire l'absorbance  $A_1$  à 340 nm ; ajouter ensuite 0,02 mL de suspension de PK ; mélanger, attendre 15 minutes et lire la nouvelle absorbance  $A_2$  ;



- ajouter alors 0,02 mL de suspension de MK, mélanger, attendre 15 minutes et lire la nouvelle absorbance  $A_3$ .

1. Quel est le principe du dosage de l'ADP ? Celui de l'AMP ?
2. Donner la composition qualitative du mélange réactif.
3. Donner l'allure de la courbe d'enregistrement  $A_{340} = f(\text{temps})$  susceptible d'être obtenue.
4. Donner les expressions semi-littérales permettant de calculer les concentrations en ADP et AMP dans le sang en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

## Corrigés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post baccalauréat.

### **Exercice 1** Etude de la $\beta$ -fructosidase de levure de boulangerie. Evaluation de la performance de la méthode d'extraction et de purification

#### 1. Calcul de la quantité de protéines

La quantité totale de protéines dans un extrait est obtenue en multipliant la concentration massique en protéine par le volume de l'extrait considéré. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

#### 2. Détermination de la concentration d'activité catalytique

- Calcul de la CAC :  $\frac{A \cdot f_E}{\alpha \cdot t \cdot V_E}$  en  $UI \cdot mL^{-1}$

- Avec : - A : absorbance mesurée pour l'essai ;  
 -  $f_E$  : facteur de dilution de l'extrait enzymatique ;  
 -  $\alpha$  : coefficient directeur de la droite d'étalonnage pour le dosage du sucre inverti ;  
 - t : temps de la réaction enzymatique en minutes ;  
 -  $V_E$  : volume d'enzyme introduit dans le milieu réactionnel en mL.

#### 3. Détermination de l'activité spécifique et de l'activité totale pour chaque extrait

L'activité spécifique est le rapport de la concentration d'activité catalytique à la concentration en protéines. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

L'activité totale est le produit de la concentration d'activité catalytique et du volume de la fraction. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

| Extrait        | Volume de l'extrait (mL) | Concentration massique en protéines ( $g \cdot L^{-1}$ ) | Quantité de protéines totales (mg) | Concentration d'activité catalytique ( $UI \cdot mL^{-1}$ ) | Activité spécifique ( $UI \cdot mg^{-1}$ ) | Activité totale (UI) |
|----------------|--------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|
| E <sub>1</sub> | 30,0                     | 1,19                                                     | 35,7                               | 39,0                                                        | 32,8                                       | 1170                 |
| E <sub>2</sub> | 9,50                     | 0,890                                                    | 8,46                               | 96,0                                                        | 108                                        | 912                  |

#### 4. Calcul du rendement et de l'enrichissement de la fraction

- Rendement (R) : quantité d'enzyme récupérée après purification par rapport à la quantité d'enzyme avant purification.

$$R = \frac{AT_{E_2}}{AT_{E_1}} \cdot 100 \quad R = 78 \%$$

- Enrichissement (E) : augmentation de la proportion d'enzyme par rapport aux protéines totales.

$$E = \frac{AS_{E_2}}{AS_{E_1}} \quad E = 3,3$$

### **Exercice 2** Purification de la phosphatase alcaline du lait

#### 1. Purification :

- étape 1 : précipitation acide des protéines enzymatiques dont la PAL (la solubilité des protéines est fonction du pH) ;
- étape 2 : précipitation des protéines par " déshydratation " du milieu (utilisation d'un solvant organique).

2. Etude des enzymes à basse température pour éviter les phénomènes de dénaturation, d'autant plus quand le traitement subi par les enzymes est très dénaturant (ex : utilisation de solvant organique).

#### 3. Activité enzymatique :

3.1. Voir le résumé du cours.

3.2. Voir le résumé du cours.

3.3 L'activité totale est donnée par la formule littérale  $AT = CAC \cdot V_E$ .

Pour l'activité totale dans le lait l'application numérique est  $AT_{\text{lait}} = 405 \cdot 6000 = 2,43 \cdot 10^{16}$  UI.

Pour les extraits E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> :

-  $AT_{E_1} = 1,05 \cdot 10^{16}$  UI

-  $AT_{E_2} = 6,60 \cdot 10^{15}$  UI

L'activité spécifique est donnée par la formule littérale  $AS = CAC / \rho_B$ . Pour l'activité totale dans le lait l'application numérique est  $AS_{\text{Lait}} = 405 / 14 = 28,9 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

Pour les extraits  $E_1$  et  $E_2$  :

- $AS_{E1} = 70,0 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$
- $AS_{E2} = 917 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$

3.4. Le rendement est donné par la formule littérale :  $R = \frac{A_{\text{Après purification}}}{A_{\text{Avant purification}}} \cdot 100$  et l'enrichissement

ou degré de purification) par la formule littérale :  $E = \frac{AS_{\text{après purification}}}{AS_{\text{avant purification}}}$ . Ce qui conduit aux applications

numériques suivantes :

- étape 1 :
  - rendement =  $1,05 \cdot 10^{16} / 2,43 \cdot 10^{16} \cdot 100 = 43,2 \%$
  - enrichissement =  $70,0 / 28,9 = 2,42$
- étape 2 :
  - rendement =  $6,60 \cdot 10^{15} / 2,43 \cdot 10^{16} \cdot 100 = 27,2 \%$
  - enrichissement =  $917 / 28,9 = 31,7$

### Exercice 3 Purification de la LDH de foie de rat

1. La concentration en protéines de l'extrait brut est de  $1,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  soit  $1,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . La quantité de protéines dans le tube de dosage est donc de  $1,1 \cdot 20 = 22 \mu\text{g}$ .

Le volume maximal de solution étalon de protéines à  $0,3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  compatible avec les conditions du dosage est de  $100 \mu\text{L}$ , ce qui correspond à une quantité de protéines de  $0,3 \cdot 100 = 30 \mu\text{g}$ . Il est donc possible d'utiliser la solution étalon de protéines telle quelle et on peut donc proposer la gamme d'étalonnage suivante :

| Tubes                               | 0   | 1  | 2  | 3  | 4  | 5   |
|-------------------------------------|-----|----|----|----|----|-----|
| Sol. étalon ( $\mu\text{L}$ )       | 0   | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée ( $\mu\text{L}$ )     | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0   |
| Réactif de Bradford ( $\text{mL}$ ) | 5   | 5  | 5  | 5  | 5  | 5   |
| $\mu\text{g}$ de protéines par tube | 0   | 6  | 12 | 18 | 24 | 30  |

2. La CAC de l'extrait brut est calculée à partir du  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  dans la partie linéaire de la courbe  $A = f(t)$ . Celui-ci peut être estimé à  $0,2$  d'où :

$$CAC = \frac{0,2 \cdot 10^6 \cdot 3 \cdot 10^{-3}}{6300 \cdot 20 \cdot 10^{-6}} = 4762 \text{ UI} \cdot \text{L}^{-1} \text{ soit } 4,76 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ ou encore } 4,76 \cdot 10^3 / 60 \text{ soit } 79,3 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$$

3. L'activité spécifique de l'extrait brut est de  $79,3 / 1,1$  soit  $72,1 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . L'enrichissement est de  $820 / 72,1$  soit environ  $11,4$ . L'activité totale de l'extrait brut est de  $79,3 \cdot 12$  soit  $952 \text{ nkat}$ , celle de l'extrait purifié de  $360,2 = 720 \text{ nkat}$ . Le rendement est de  $720 \cdot 100 / 952$  soit environ  $75,6 \%$ .

### Exercice 4 Etude de la cinétique de la phosphatase alcaline

1. Equation de Michaelis et Menten :  $v_i = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]}$

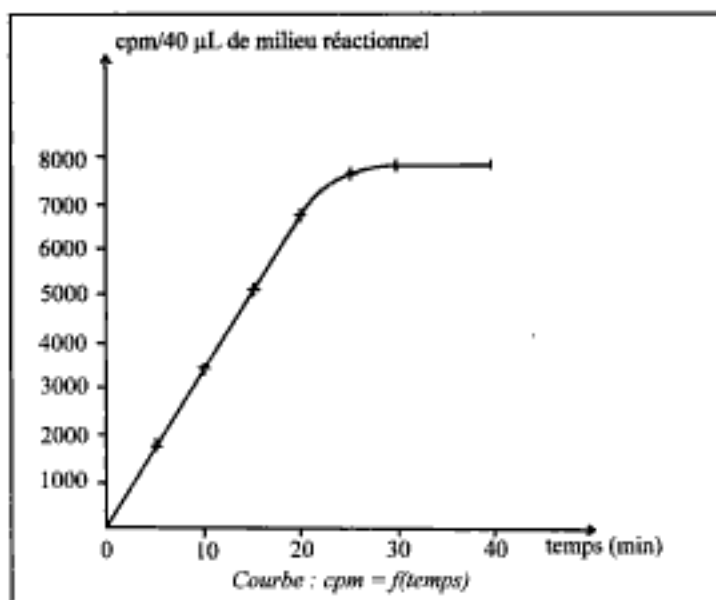
Pour les questions 1.2. et 1.3., voir le résumé du cours.

Cette équation peut également s'écrire :  $\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$ .

2. Le tracé  $1/v_i = f(1/[S])$  permet de déterminer les valeurs de  $K_M$  et  $V_{\text{max}}$  :  $K_M = 4,99 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  et  $V_{\text{max}} = 0,624 \text{ u.a.}$  Si l'on doublait la concentration en substrat,  $K_M$  ne changerait pas et  $V_{\text{max}}$  serait doublée.

### Exercice 5 Étude d'une hexokinase de levure

1. Le tracé de la courbe cpm pour 40  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel en fonction du temps est assimilable à la courbe du cours  $P = f(t)$ .



La partie linéaire du début de la courbe permet de déterminer la vitesse initiale et le plateau (fin de la réaction enzymatique) permet de calculer la concentration en glucose-6-phosphate qui est égale à la concentration initiale en glucose, puisque la stoechiométrie de la réaction irréversible est égale à 1.

En 10 minutes, on a 3400 cpm pour 40  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel. On a donc  $\frac{3400}{10 \cdot 40 \cdot 10^{-3}}$  cpm pour 1 mL de milieu réactionnel et pour 1 minute, c'est à dire pour 0,1 mL d'enzyme,

ou encore :  $\frac{3400}{10 \cdot 40 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 \cdot 2000}$  nmol.min<sup>-1</sup>.(mL d'enzyme)<sup>-1</sup>, soit 42,5 unités par mL d'enzyme.

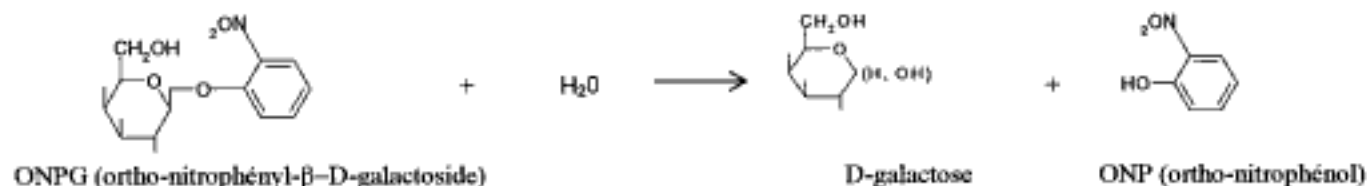
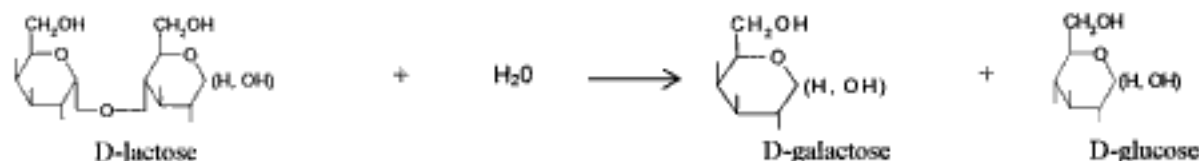
2. La concentration en enzyme est de  $60 \cdot 10^{-3} / 0,1 = 0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  et l'activité spécifique de  $42,5 / 0,6 = 70,8 \text{ unités} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

3. A la fin de l'expérience, on a 7800 cpm pour 40  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel. Cela représente  $\frac{7800}{40 \cdot 10^{-3} \cdot 2000} = 97,5$  nmol de phosphate incorporé au glucose, donc aussi 97,5 nmol de glucose au départ dans le milieu réactionnel, soit une concentration de  $97,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Cette valeur étant plus de 10 fois supérieure à la valeur du  $K_M$  vis à vis du glucose ( $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), on se trouve dans des conditions correctes pour la détermination de l'activité enzymatique.

### Exercice 6 Cinétique de la $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*

1. Équations des réactions d'hydrolyse du lactose et de l'ortho-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside par la  $\beta$ -galactosidase



2.1. Le substrat S et le produit P absorbent tous deux à 373 nm. Si l'on appelle  $C_S$  et  $C_P$  respectivement les concentrations en substrat et produit, compte tenu de la règle d'additivité de la loi de Beer-Lambert, on peut écrire

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C = \epsilon_P \cdot l \cdot C_P + \epsilon_S \cdot l \cdot C_S$$

$$\Delta A / \Delta t = \epsilon_P \cdot l \cdot \Delta C_P / \Delta t + \epsilon_S \cdot l \cdot \Delta C_S / \Delta t$$

Or,  $\Delta C_S / \Delta t = -\Delta C_P / \Delta t$ , donc  $\Delta A / \Delta t = (\epsilon_P - \epsilon_S) \cdot l \cdot \Delta C_P / \Delta t$

2.2. Les concentrations initiales en substrat (ONPG) dans le milieu d'incubation sont calculées comme suit :

$$C_{\text{ONPG des milieux d'incubation}} = \frac{C_{\text{ONPG}} (1,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}) \cdot \text{volume ONPG ajouté dans les cuves (en mL)}}{\text{volume total des cuves (3 mL)}}$$

Cela donne les concentrations suivantes :  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  et  $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  respectivement pour les mélanges 1, 2, 3 et 4.

Les paramètres cinétiques sont déterminés par la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk.

On a :

$$1 / K_M = -1,8 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}, \text{ d'où } K_M = 5,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

2.3. On a  $1 / V_{\text{max}} = 2,05 \text{ min}$ , d'où  $V_{\text{max}} = 0,488 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ .

L'activité spécifique est de  $\frac{0,488 \cdot 10^6}{(2400 - 350)} = 238 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{L milieu réactionnel})^{-1}$ .

Dans la cuve de 3 mL, l'activité de  $238 \cdot 3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ , ceci pour une masse d'enzyme de 0,025 mg, d'où l'activité spécifique  $238 \cdot 3 \cdot 10^{-3} / 0,025 = 28,6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

2.4. L'AMS ou AEM est de  $28,6 \cdot 10^6 \cdot 540000 \cdot 10^3 / 60 = 257 \text{ kat} \cdot (\text{mol d'enzyme})^{-1}$  soit  $257 \text{ s}^{-1}$ .

### Exercice 7 Cinétique de la $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli* (variante)

Il convient de calculer la concentration en substrat  $C_S$  dans les différents essais. Le calcul s'effectue à partir de l'absorbance finale, puisqu'à ce moment le produit a une concentration identique à celle du substrat initial.

Sans indication, on admet généralement que le trajet optique de la cuve spectrophotométrique est de 1 cm.

$$C_S = A_{\text{finale}} / \epsilon_P$$

Les différentes concentrations en substrat sont de  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  et  $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Il serait aussi possible de calculer  $C_S$  à partir des absorbances initiales :

$$C_S = A_{\text{initiale}} / \epsilon.$$

Il faut évidemment connaître  $\epsilon_S$ .

Comme on a :  $C_S = A_{\text{finale}} / \epsilon_P = A_{\text{initiale}} / \epsilon_P$ , donc  $\epsilon_S = A_{\text{initiale}} \cdot \epsilon_P / A_{\text{finale}}$ .

On retrouve la valeur de  $350 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (cf exercice 6).

La représentation en double inverse permet de trouver la valeur de  $K_M$  ( $5,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  comme dans l'exercice précédent).

Le  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  maximum est à nouveau de 0,488.

Le calcul de l'AEM est le suivant,

$$\text{AEM} = 0,488 / ((2400 - 350) \cdot 60 \cdot 1,54 \cdot 10^{-4}) = 258 \text{ kat} \cdot (\text{mole d'enzyme})^{-1}$$

Remarque : dans le calcul de l'AEM, il convient d'appliquer la loi de Beer-Lambert avec un facteur  $(\epsilon_P - \epsilon_S)$ . Les explications figurent au niveau de l'exercice 6.

### Exercice 8 Etude de la cinétique de la $\beta$ -galactosidase

1. Cinétique de la réaction catalysée par la  $\beta$ -galactosidase.

- pour l'écriture de la réaction catalysée voir exercice 6.
- $\beta$ -galactosidase : enzyme qui fait partie de la classe des hydrolases (ici, hydrolyse d'une liaison osidique).
- Reconnaissance spécifique du motif "  $\beta$ -D-galactose ".

2. La réaction d'hydrolyse

- Allure de la courbe. Trois phases :
  - phase 1 : proportionnalité entre l'ONP apparu et le temps, ce qui permet de déterminer la vitesse initiale de la réaction. La concentration en substrat étant saturante, on a  $v_i \approx V_{\text{max}}$ . Ceci permettra de calculer l'activité enzymatique et la CAC de l'enzyme ;
  - phase 2 : ralentissement de la cinétique ;
  - phase 3 : vitesse de réaction nulle, substrat épuisé.

- $v_i = 12 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$  (de milieu réactionnel)
- $\text{CAC} = 1,0 \mu\text{kat} \cdot \text{mL}^{-1}$
- $\text{AS} = 5,0 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$

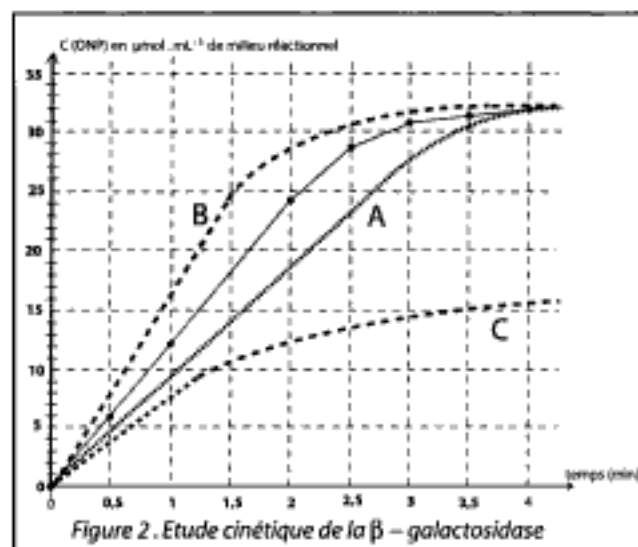
3. L'activité spécifique (AS) peut être considérée comme un critère de pureté de l'enzyme. L'extrait E présente une AS de  $5,0 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$  et l'extrait commercial une AS de  $10,5 \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . L'activité plus faible laisse à penser qu'une purification complémentaire reste possible.

Il faut cependant noter que l'étude expérimentale a été effectuée à  $+30^\circ\text{C}$  alors que la température optimale de l'enzyme est de  $+37^\circ\text{C}$ . L'énergie d'activation de la réaction n'étant pas connue, on ne peut, en toute rigueur, conclure.

#### 4. Série d'expériences

- Expérience A :  $\text{pH} > \text{pH optimal} \rightarrow$  L'activité ( $v_i$ ) de la réaction sera plus faible.  
(Tracé avec une pente inférieure à l'expérience initiale, même absorbance maximale)
- Expérience B :  $+37^\circ\text{C}$ , température égale à la température optimale et supérieure à la température de l'expérience initiale  
 $\rightarrow$  L'activité ( $v_i$ ) de la réaction sera augmentée.  
(Tracé avec une pente supérieure à l'expérience initiale, même absorbance maximale)
- Expérience C : concentration en substrat de  $0,110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Ce qui est égal au  $K_M$  de l'enzyme. La vitesse initiale de la réaction sera égale à la vitesse initiale maximale de la réaction divisée par 2.  
(Tracé avec une pente inférieure à l'expérience initiale, absorbance maximale divisée par 2)

Voir représentation ci-dessous :



#### Exercice 9 Etude de l'influence du pH sur la cinétique de la $\beta$ -fructosidase de levure

1. Le tracé de la courbe (non représentée ici) montre que  $\text{pH optimal} = 4,5$  et pour ce pH,  $V_{\text{max}} = 0,85 \text{ UI}$ .

#### 2. Paramètres cinétiques

2.1. A  $\text{pH} = 5,5$ , les paramètres cinétiques sont :  
 -  $K_M = 45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ;  
 -  $V_{\text{max}} = 0,55 \text{ UI}$ .

2.2. L'affinité (modèle michaelien simple supposé) et l'activité diminuent ( $K_M$  passe de 30 à  $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $V_{\text{max}}$  de 0,85 à 0,55 UI) lorsque le pH passe de 4,5 à 5,5.

2.3. Le pH modifie l'ionisation des acides aminés constitutifs des protéines enzymatiques. La structure tertiaire et en particulier la géométrie du centre actif des enzymes sont modifiées. La capacité de l'enzyme à fixer le substrat ( $K_M$ ) et la capacité à catalyser sa transformation ( $V_{\text{max}}$ ) sont modifiées.

#### Exercice 10 Etude de la ribonucléase (RNase) pancréatique

1. La courbe  $V_{\text{max}} = f(\text{pH})$  (voir résumé du cours) est une courbe en cloche classique. Le pH optimal d'activité se situe aux environs de  $\text{pH} = 7$ .

2. La représentation de Dixon  $\log(V_{\text{max}}) = f(\text{pH})$  (non représentée ici) permet de tracer 3 droites (technique des tangentes) dont les intersections permettent de déterminer les  $\text{pK}'_1$  et  $\text{pK}'_2$  des chaînes latérales des acides aminés du site actif dans le complexe michaelien, soit environ 6 et 8. Ces  $\text{pK}'$  sont en général quelque peu différents des  $\text{pK}$  des chaînes latérales des acides aminés libres.

Puisqu'il s'agit de 2 résidus histidine, le pK de la chaîne latérale de l'histidine étant voisin de 7, une histidine est donc protonée et fonctionne comme acide, alors que l'autre est déprotonée et fonctionne comme base. Les résultats sont donc compatibles avec le mécanisme réactionnel acide – base proposé.

### Exercice 11 Activation thermique de la $\alpha$ -galactosidase

La loi d'Arrhénius est la suivante  $k = C \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}}$  (voir résumé du cours).

La constante de vitesse  $k$  de la réaction peut être assimilée à  $\Delta A / 5 \text{ min}$ . On a donc  $\Delta A / 5 \text{ min} = C \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}}$ ,  $E_A$  est l'énergie d'activation en  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $T$  la température absolue en degrés Kelvin ( $T = t^\circ\text{C} + 273$ ) et  $R$  la constante des gaz parfaits soit  $8,32 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ .

On a également  $\ln(\Delta A / 5 \text{ min}) = \ln C - E_A / RT$ . La représentation graphique appropriée est donc la suivante :

$\ln(\Delta A / 5 \text{ min}) = f(1/T)$ . On doit normalement obtenir une droite, dont la pente est égale à  $-E_A / R$ . Il sera alors simple d'en déduire  $E_A$ .

|                                 |          |          |          |          |          |          |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| $\ln(\Delta A / 5 \text{ min})$ | - 1,187  | - 1,109  | - 0,994  | - 0,882  | - 0,807  | - 0,734  |
| $1/T (\text{K}^{-1})$           | 0,003356 | 0,003333 | 0,003300 | 0,003268 | 0,003241 | 0,003657 |

L'équation de la droite obtenue est :  $\ln(\Delta A / 5 \text{ min}) = 10,512 - 3,4864 \cdot 10^3 / T$ ,  
 $E_A = 3,4864 \cdot 10^3 \cdot 8,32 = 29007 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$  soit  $29 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

### Exercice 12 Stabilité thermique de la thrombine

1. Soit  $A_R$  l'activité résiduelle ( $\Delta A / \Delta t$  dans l'exercice) et  $A_0$  l'activité de l'enzyme non dénaturée, le modèle cinétique d'ordre 1 s'écrit

$$A_R = A_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (k_d \text{ est la constante de vitesse de dénaturation à } +37^\circ\text{C exprimée en } \text{min}^{-1} \text{ et } t \text{ le temps d'exposition de l'enzyme à la température d'étude en min).}$$

On a aussi  $\ln(A_R) = \ln(A_0) - k_d \cdot t$  ou encore  $\ln(A_R) = \text{constante} - k_d \cdot t$ . En représentant  $\ln(A_R)$  en fonction de  $t$  et si l'ordre 1 est vérifié, on doit obtenir une droite.

|                            |         |         |         |         |         |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| $\Delta A / \Delta t$      | 0,615   | 0,581   | 0,532   | 0,491   | 0,459   |
| $\ln(\Delta A / \Delta t)$ | - 0,486 | - 0,543 | - 0,631 | - 0,711 | - 0,779 |
| $t$ en minutes             | 0       | 30      | 60      | 90      | 120     |

En représentant  $\ln(\Delta A / \Delta t)$  en fonction de  $t$ , on obtient effectivement une droite, le modèle cinétique proposé est donc pertinent.

2. L'équation de la droite évoquée ci-dessus est :  $\ln(\Delta A / \Delta t) = - 0,0025115 \cdot t - 0,47936$

On en déduit  $k_d = 0,00251 \text{ min}^{-1}$ .

La demi-vie de la thrombine ( $t_{1/2}$ ) se calcule pour  $A_R = A_0 / 2$ , on a alors  $A_0 / 2 = A_0 \cdot e^{-k_d \cdot t/2}$  et  $t_{1/2} = \ln 2 / k_d = 276 \text{ min}^{-1}$ .

### Exercice 13 Etude de la glucose-6-phosphate déshydrogénase

1. Influence de la concentration en substrat

1.1. Concentration en substrat : paramètres cinétiques

-  $K_M$  : [S] pour laquelle  $v_i = V_{\text{max}} / 2$ . Elle représente, dans certaines conditions, l'inverse de l'affinité de E pour S ;

-  $V_{\text{max}}$  : vitesse initiale maximale : valeur (théorique) maximale que peut atteindre la  $v_i$  lorsque la concentration de substrat est saturante ( $[S] > 10 \cdot K_M$ ).

1.2. D'après la représentation de Lineweaver et Burk :

$$- V_{\text{max}} = 50 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$- K_M = 0,75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

2. Étude de deux effecteurs

2.1. Rôles des effecteurs

- En présence de glycéraldéhyde-3-phosphate ( $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) :

$$- V_{\text{max}} = 50 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$- K_M = 2,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

- En présence de ribulose-5-phosphate ( $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) :

$$- V_{\text{max}} = 50 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$- K_M = 5,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

- Les effecteurs sont des inhibiteurs compétitifs pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

2.2. L'effecteur ayant la plus grande efficacité est le ribulose-5-phosphate,  $K_M$  fortement augmenté.

**Exercice 14** Relations enzyme-substrat et enzyme-inhibiteurs

L'un des inhibiteurs est compétitif et l'autre non compétitif. La présence d'un inhibiteur compétitif modifie la valeur de  $K_M$ , alors que la  $V_{max}$  reste inchangée. La présence d'un inhibiteur non compétitif ne modifie pas  $K_M$ , mais la  $V_{max}$  se trouve être diminuée.

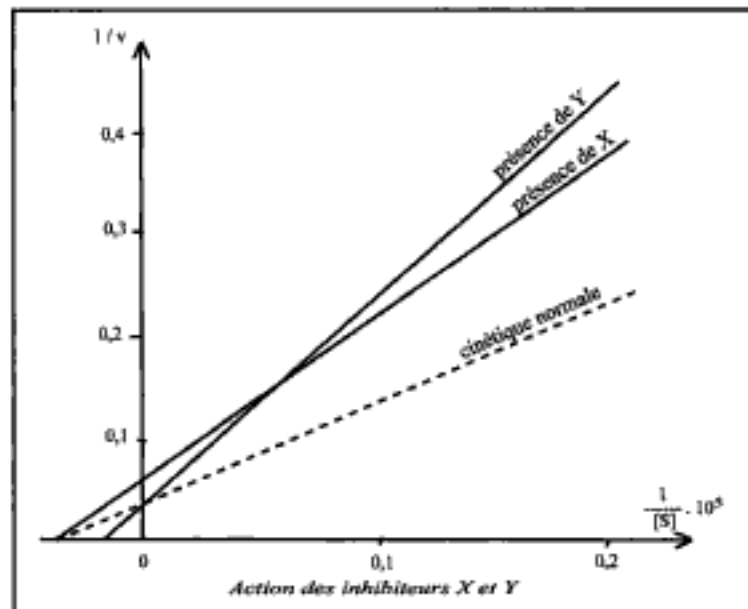
D'après les résultats expérimentaux,  $V_{max}$  en présence de Y est supérieure à  $V_{max}$  en présence de X. Il est donc possible d'affirmer que Y est l'inhibiteur compétitif et X l'inhibiteur non compétitif.

Il est possible de tracer la cinétique normale en représentation de Lineweaver et Burk, puisque l'on a 2 points de la droite :

- $1 / V_{max}$  de l'enzyme sans inhibiteur identique à  $1 / V_{max}$  en présence de Y et
- $-1 / K_M$  identique à  $-1 / K_M$  en présence de X (voir le graphique ci-dessus).

Il est maintenant possible de déterminer les caractéristiques de l'enzyme en l'absence d'inhibiteur :

- $1 / V_{max} = 0,04 \text{ min} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ , d'où  $V_{max} = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$
- $-1 / K_M = -0,04 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , d'où  $K_M = 25 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$



Il est également possible de déterminer la pureté de l'enzyme.

On utilise  $10 \mu\text{L}$  de solution enzymatique à  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , soit  $25 \mu\text{g}$  d'enzyme ou encore  $25 \cdot 10^{-6} / 125000 = 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol}$ , qui transforment  $25 \cdot 10^{-6} \text{ mol S} \cdot \text{min}^{-1}$ , d'où, dans ces conditions :

$$\text{AEM} = 25 \cdot 10^{-6} / 2 \cdot 10^{-10} = 125000 \text{ mol S} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mol E})^{-1}$$

La pureté de l'enzyme est :  $125000 \cdot 100 / 175000 = 71,4 \%$ .

Il reste à déterminer les  $K_I$  des deux inhibiteurs.

En présence de l'inhibiteur X, la  $V_{max}$  de l'enzyme est divisée par un facteur d'inhibition  $F_1 = 1 + [I] / K_I$ . En faisant le rapport des ordonnées à l'origine, on a  $(F_1 / V_{max}) / (1 / V_{max})$ , soit  $F_1$ .

$$F_1 = 1,5 = 1 + [I] / K_I$$

On en déduit que  $K_I = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

En présence de l'inhibiteur Y,  $K_M$  de l'enzyme devient  $K_M \cdot F_2$ .  $F_2$  étant défini comme précédemment. En faisant le rapport des abscisses à l'origine, on a  $(-1 / K_M) / (-1 / K_M \cdot F_2)$ , soit  $F_2$ .

$$F_2 = 2 = 1 + [I] / K_I$$

On en déduit que  $K_I = 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Exercice 15** Etude cinétique de la glutamate déshydrogénase

## 2. Exploitation des résultats

2.1. Pour déterminer l'influence d'un paramètre sur la cinétique enzymatique, il est nécessaire de maintenir constants tous les autres paramètres expérimentaux. La glutamate déshydrogénase possède deux substrats : l'acide glutamique et le NAD oxydé. Il est nécessaire de scinder l'étude en deux parties : fixer une concentration saturante pour l'un des substrats et déterminer les constantes cinétiques pour l'autre substrat, puis intervertir les substrats pour refaire l'étude.

Lorsqu'un substrat est en concentration saturante ( $[S] < 10 \cdot K_M$ ), l'ordre réactionnel par rapport à ce substrat est nul ; il n'a pas d'influence sur



la cinétique de la réaction. Seul le substrat en concentration non saturante influe sur la cinétique enzymatique, ce qui est nécessaire à l'étude des paramètres cinétiques.

2.2. Equation de Michaelis et Menten : 
$$v_i = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

2.3. Paramètres cinétiques :

- $K_M$  : [S] pour laquelle  $v_i = V_{\max} / 2$ . Elle représente, dans certaines conditions, l'inverse de l'affinité de E pour S ;
- $V_{\max}$  : vitesse initiale maximale : valeur (théorique) maximale que peut atteindre la  $v_i$  lorsque la concentration de substrat est saturante ( $[S] > 10 \cdot K_M$ ).

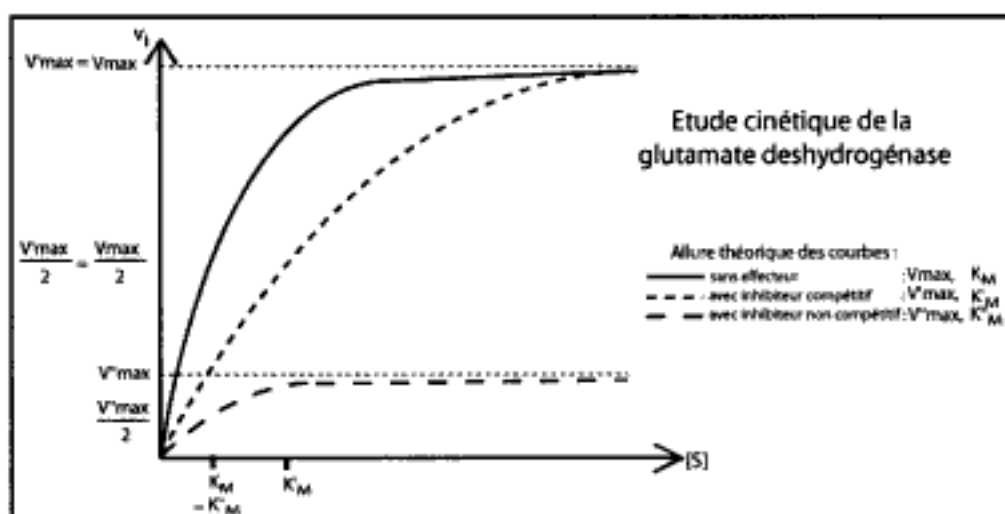
- 2.4. Paramètres cinétiques :
- pour l'acide glutamique :  $K_M = 0,80 \text{ mmol.L}^{-1}$   
 $V_{\max} = 4,0 \text{ Unités arbitraires}$
  - pour le NAD oxydé :  $K_M = 0,050 \text{ mmol.L}^{-1}$   
 $V_{\max} = 2,5 \text{ Unités arbitraires}$

### 3. Représentations graphiques

3.1. Le tracé en double inverse d'une cinétique normale, en présence d'un inhibiteur compétitif et non compétitif se trouve dans l'exercice 14.

3.2. Voir représentation ci-dessous de l'allure théorique des courbes que l'on obtiendrait en représentation de Michaelis et Menten :

- en présence d'un inhibiteur compétitif de la glutamate déshydrogénase ;
- en présence d'un inhibiteur non compétitif de la glutamate déshydrogénase.



### Exercice 16 Créatine kinase (CK)

1. Créatine kinase : classe des transférases, il y a transphosphorylation de la créatine en créatine phosphate aux dépens de l'ATP.

2. Allure de la courbe. Deux phases :

- phase 1 : proportionnalité entre produit formé et le temps, ce qui permet de déterminer la vitesse initiale de la réaction.  $v_i$  = pente de la tangente à la courbe cinétique lorsque  $t$  tend vers 0 (confondu, ici, avec la pente de la partie linéaire de la courbe) ;
- phase 2 : ralentissement de la cinétique.

3. Détermination des constantes cinétiques de la créatine kinase

3.1. Pour le substrat " ATP ", on a :  $V_{\max} = 5,0 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $K_M = 0,40 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

3.2. Pour le substrat " créatine ",  $K_M = 20 \text{ mmol.L}^{-1}$ . L'enzyme étudiée a plus d'affinité pour l'ATP que pour la créatine (ce qui ne préjuge pas du mécanisme enzymatique lui-même).

3.3. Le pH influe au niveau de l'ionisation des acides aminés constitutifs des protéines enzymatiques. La structure tertiaire et en particulier la géométrie du centre actif des enzymes pourra être modifiée. La capacité de l'enzyme à fixer le substrat ( $K_M$ ) et la capacité à catalyser sa transformation ( $V_{\max}$ ) pourront être modifiées.

4. Les isoenzymes de la créatine kinase

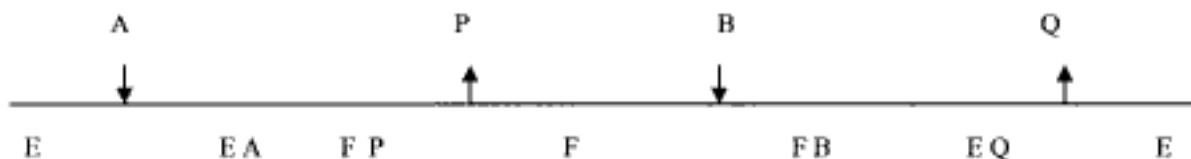
4.1. Isoenzymes : enzymes portant le même nom, catalysant la même réaction sur le(s) même(s) substrat(s) mais ayant une structure tridimensionnelle différente. Les différences structurales des isoenzymes sont déterminées génétiquement (structure quaternaire différente, en raison de l'association des sous unités structurellement voisines mais différentes).

4.2. Trois isoenzymes possibles : MM, MB et BB (séparation électrophorétique possible car les pI, des isoenzymes sont généralement différents).

**Exercice 17** Étude de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

## 1. Réaction "Bi-Bi Ping-pong"

## 1.1. Représentation de Cleland



Remarque : P est l' $\alpha$ -cétoglutarate et Q l'aspartate.

## 1.2 Equation des vitesses

Si A est en large excès, le terme  $K_M/[A]$  tend vers zéro et l'équation des vitesses est de la forme :

$$v_i = \frac{V_{\max}}{1 + K_B/[B]} = \frac{V_{\max} \cdot [B]}{K_B + [B]}$$

On retrouve l'équation de Michaelis pour une réaction simple à un substrat et un produit. Ce modèle est donc intéressant bien qu'il ne s'adresse, a priori, qu'à des exemples fort peu nombreux.

2. La détermination de  $K_B$  doit s'effectuer quand A est en large excès, c'est à dire au niveau de la représentation graphique, quand  $1/[A]$  tend vers zéro. Les [B] sont données au niveau des courbes et les  $1/v_i$  correspondent, compte tenu de ce qui a été dit précédemment, aux ordonnées à l'origine.

|                                            |                       |                       |                       |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| [B] en mol.L <sup>-1</sup>                 | 1,20.10 <sup>-5</sup> | 1,82.10 <sup>-5</sup> | 3,64.10 <sup>-5</sup> | 1,67.10 <sup>-4</sup> |
| 1 / v <sub>i</sub> en (u.a.) <sup>-1</sup> | 24,1                  | 20,1                  | 16,0                  | 13,1                  |

Par la représentation en double inverse (dite représentation secondaire ici), on obtient la droite d'équation :

$$1/v_i = 1,431 \cdot 10^4 \cdot 1/[B] + 12,183$$

donc  $V_{\max} = 0,0821$  unité arbitraire et  $K_B = 1,17 \cdot 10^5$  mol.L<sup>-1</sup>.

Pour déterminer  $K_A$ , il est possible de sélectionner une [A] donnée, par exemple 0,02 mol.L<sup>-1</sup>, soit  $1/[A] = 50$  L.mol<sup>-1</sup> et tracer la courbe  $1/v_i = f(1/[B])$ . On obtient l'équation suivante :

$$1/v_i = 1,462 \cdot 10^4 \cdot 1/[B] + 13,627$$

On sélectionne la vitesse initiale pour B saturant, c'est à dire  $1/13,627 = 0,0734$  u.a.

Cette vitesse est alors injectée dans l'équation de Michaelis :  $v_i = V_{\max} \cdot [A] / (K_A + [A])$ , équation valable quand B est saturant.

$V_{\max} = 0,0821$  unité arbitraire,  $[A] = 0,02$  mol.L<sup>-1</sup> et donc  $K_A = 2,37 \cdot 10^5$  mol.L<sup>-1</sup>.

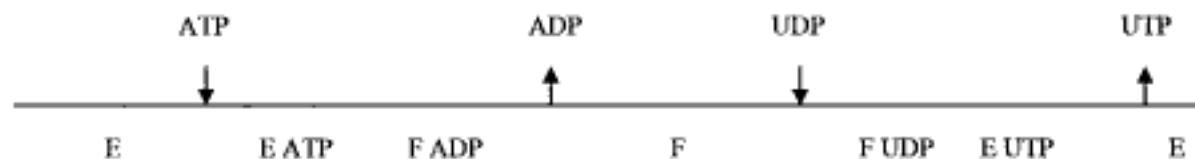
Il serait possible de recommencer cette opération avec d'autres [A] et de déterminer, au final,  $K_A$  par une représentation graphique en double inverse. Cela représenterait, à coup sûr, un travail fastidieux !

**Exercice 18** Mécanisme enzymatique d'une nucléoside-diphosphate kinase (NDP-kinase)

Rappel de la réaction catalysée :  $ATP + UDP \rightleftharpoons ADP + UTP$

1. L'obtention d'une série de droites parallèles est caractéristique d'une réaction de type "Bi-Bi ping-pong". En langage imagé, on peut dire que l'enzyme est assimilable à la table de ping-pong, le phosphate étant la balle.

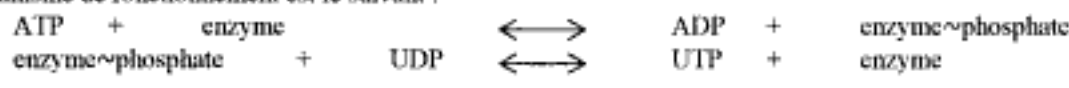
La représentation de Cleland donne :



2. L'ADP se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'UDP (figure 4), ces analogues structuraux se fixent sur la même forme enzymatique F.

L'UTP se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'ATP (figure 3), ces analogues structuraux se fixent sur la même forme enzymatique E.

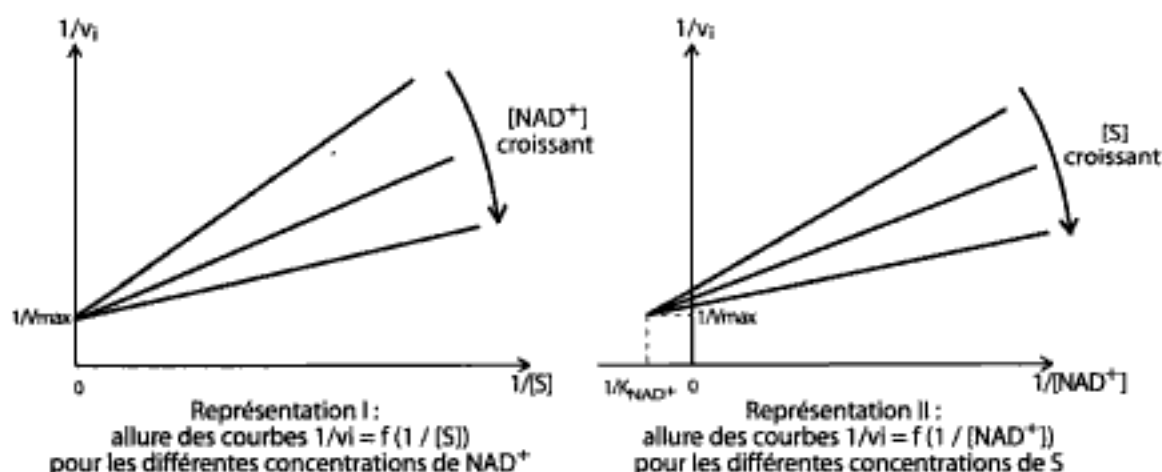
Le mécanisme de fonctionnement est le suivant :



Remarque : la spécificité des NDP-kinases est assez large pour les bases, elles fonctionnent avec des nucléotides à ribose ou désoxyribose. Il y a toujours un état où l'enzyme est phosphorylée, mais le mécanisme n'est pas toujours de type "Bi-Bi ping-pong".

**Exercice 19** Etude d'une enzyme à NAD

1. Il convient d'effectuer les représentations suivantes :  $1/v_i = f(1/[S])$  pour les différentes  $[\text{NAD}^+]$ , représentation I et  $1/v_i = f(1/[\text{NAD}^+])$  pour les différentes  $[S]$ , représentation II :



Ces représentations montrent clairement une dissymétrie de comportement des 2 substrats, ce qui fait penser à un mécanisme de type Bi-Bi ordonné. La fixation préalable du dimucléotide est indispensable à la mise en conformité du site actif pour le substrat. Pour la représentation de Cleland, voir le résumé du cours.  $\text{NAD}^+$  est assimilable à A et S à B.

2. La représentation secondaire consiste à tracer  $1/v_i = f(1/[S])$ ,  $v_i$  étant les vitesses obtenues à partir de la représentation II pour des  $[\text{NAD}^+]$  saturantes (ordonnées à l'origine).

| [S] en mol.L <sup>-1</sup> | 1/v <sub>i</sub> en (u.a) <sup>-1</sup> |
|----------------------------|-----------------------------------------|
| 4.0.10 <sup>-5</sup>       | 2,33                                    |
| 10.10 <sup>-5</sup>        | 1,39                                    |
| 20.10 <sup>-5</sup>        | 1,07                                    |

La représentation de Lineweaver et Burk donne les résultats suivants :  
 $V_{\text{max}} = 1,32 \text{ u.a}$  et  $K_S = 8,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

3. Pour ce qui concerne la représentation I, quand  $1/[S] \rightarrow 0$  alors  $1/v_i \rightarrow 1/V_{\text{max}}$ . Les coordonnées du point d'intersection sont donc 0 pour l'abscisse et  $1/V_{\text{max}}$  pour l'ordonnée, ce qui donne une  $V_{\text{max}}$  d'environ 1,28 u.a., ce qui est proche de la valeur obtenue à la question 2.

Pour ce qui concerne la représentation II, il suffit d'écrire l'équation de la vitesse pour deux concentrations différentes en substrat  $S_1$  et  $S_2$  et évaluer les expressions obtenues. En effet, au point d'intersection des droites,  $1/v_i$  est identique.

$$\frac{1}{V_{\text{max}}} \left( 1 + \frac{K_{\text{NAD}}}{[\text{NAD}^+]} \right) \cdot \frac{K_S}{[S_1]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} = \frac{1}{V_{\text{max}}} \left( 1 + \frac{K_{\text{NAD}}}{[\text{NAD}^+]} \right) \cdot \frac{K_S}{[S_2]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

L'égalité est vérifiée seulement si l'on a  $[\text{NAD}^+] = -K_{\text{NAD}}$ .

Les coordonnées du point d'intersection sont donc de  $-1/K_{\text{NAD}}$  pour l'abscisse et  $1/V_{\text{max}}$  pour l'ordonnée.

Cela donne  $K_{\text{NAD}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  et  $V_{\text{max}} = 1,43 \text{ u.a.}$ , ce qui est relativement proche des valeurs de la  $V_{\text{max}}$  précédemment obtenues.

4. En cas de pénurie relative de S ( $[S] = 0,1 \cdot K_S$  et  $[\text{NAD}^+] = 10 \cdot K_{\text{NAD}}$ ), en reportant dans l'expression de la vitesse, on trouve  $v_i = V_{\text{max}} / 12 = 0,083 \cdot V_{\text{max}}$ .

En cas de pénurie relative de  $\text{NAD}^+$ , ( $[\text{NAD}^+] = 0,1 \cdot K_{\text{NAD}}$  et  $[S] = 10 \cdot K_S$ ), en reportant dans l'équation de la vitesse, on trouve  $v_i = 0,48 \cdot V_{\text{max}}$ .

La pénurie relative de  $\text{NAD}^+$  est moins pénalisante au niveau de la vitesse que celle de S, ce qui peut être une solution à un problème de disponibilité métabolique du  $\text{NAD}^+$ .

**Exercice 20** Etude de l'aspartokinase I d'*Escherichia coli*

1. En l'absence de thréonine, la courbe  $v_i = f([S])$  est une hyperbole, traduisant une cinétique michaelienne. En présence de thréonine, la courbe  $v_i = f([S])$  est une sigmoïde, ce qui indique que l'enzyme perd son caractère michaelien et que la thréonine fonctionne comme inhibiteur allostérique.

2. La représentation en double inverse en l'absence de thréonine permet d'aboutir à l'équation suivante :

$$1/v_i = 1,9211 \cdot 10^{-3} \cdot 1/[S] + 994,22 \cdot 10^{-3}$$

On en déduit  $V_{\max} = 1,0058$  soit environ 1 unité arbitraire et  $K_M = 1,93 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

3. La représentation de Hill donne une droite pour chaque cas de figure.

En l'absence de thréonine, on a l'équation suivante :

$$\log(v_i/(V_{\max} - v_i)) = 0,997 \cdot \log[S] + 2,7074$$

On a un indice de coopérativité de 1, ce qui traduit le caractère michaelien de la cinétique. De plus,  $-\log K_M = 2,7074$ , donc  $K_M = 1,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , ce qui est en bon accord avec la valeur déterminée à la question 2.

En présence de thréonine, on a l'équation suivante :

$$\log(v_i/(V_{\max} - v_i)) = 3,11 \cdot \log[S] + 6,2828$$

L'indice de coopérativité est donc de 3,1 en présence de thréonine.

**Exercice 21** Détermination de l' $\epsilon_{405}$  du paranitrophénol

1. Le mélange réactionnel est constitué par une solution de PNPP dans un tampon basique. Pour déterminer valablement la CAC, la [PNPP] doit être plus de dix fois supérieure à la valeur de  $K_M$ .

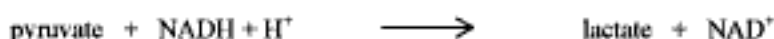
2. Calcul de l' $\epsilon_{405}$  du PNP

$$\text{CAC} = 3300 \cdot \Delta A \cdot \text{min}^{-1} = \frac{3,05 \cdot 10^6 \cdot \Delta A \cdot \text{min}^{-1}}{\epsilon_{405} \cdot 0,05} \text{ en U.L.L}^{-1}$$

On en déduit que l' $\epsilon_{405}$  du PNP est quasiment égal à  $18500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ou  $18500 \cdot 10^{-3} \cdot 10^2$  soit  $1850 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ . Cette valeur est conforme à celle trouvée dans la littérature.

**Exercice 22** Détermination de l' $\epsilon_{340}$  de NADH

La réaction envisagée ici est la suivante :



Les absorbances initiale ( $A_i$ ) et finale ( $A_f$ ) étant mesurées dans des volumes réactionnels différents, les calculs en concentration ne pourraient s'effectuer qu'en ramenant les absorbances à un même volume réactionnel. Il est également possible d'effectuer les calculs en nombre de moles, ce qui donne :

$$\text{nombre de moles de NADH initialement présentes : } n_i = c_i \cdot v_i = A_i \cdot v_i / \epsilon = 0,625 \cdot 1,5 \cdot 10^{-3} / \epsilon$$

avec  $v_i$ , volume initial

$$\text{nombre de moles de NADH à la fin de la réaction : } n_f = c_f \cdot v_f = A_f \cdot v_f / \epsilon = 0,190 \cdot 2,5 \cdot 10^{-3} / \epsilon$$

avec  $v_f$ , volume final

On écrit que  $\Delta n = n_i - n_f =$  nombres de moles de pyruvate ajoutées, soit  $73,3 \cdot 10^{-6} \cdot 1 \cdot 10^{-3} = 73,3 \cdot 10^{-9}$  moles.

Le calcul à partir de :

$$\Delta n = 73,3 \cdot 10^{-9} = n_i - n_f = 0,625 \cdot 1,5 \cdot 10^{-3} / \epsilon - 0,190 \cdot 2,5 \cdot 10^{-3} / \epsilon$$

permet de retrouver quasiment  $\epsilon_{340}$  du NADH =  $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , ce qui est conforme à la valeur trouvée dans la littérature.

**Exercice 23** Etude d'une préparation de LDH

1. Calcul de la concentration en protéines de la préparation de LDH

Les conditions expérimentales sont identiques pour les trois essais : même concentration en réactif du biuret, même temps de développement de la coloration, même trajet optique de la cuve, même volume de prise d'essai, même volume final, ...

L'absorbance est donc proportionnelle à la concentration de la solution de protéine introduite à raison de 2 mL par essai.

L'essai 1 est un blanc réactif ; l'essai 2 est un étalon de concentration  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  et l'essai 3 correspond au dosage.

D'autre part, il faut soustraire des valeurs d'absorbance des essais 2 et 3 celle du blanc réactif (essai 1).

Ainsi à une concentration en protéine de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  correspond une absorbance de  $0,250 - 0,050$  soit  $0,200$  ; à la préparation de LDH,  $0,290 - 0,050$  soit  $0,240$ .

La concentration P en protéine est donc :

$$P = 1,0240 / 0,200 = 1,2 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ de préparation de LDH}$$

## 2. Variation de l'absorbance

Le NADH introduit dans la cuve va réduire le pyruvate sous l'influence de la LDH : l'absorbance à 340 nm va diminuer en fonction du temps, d'abord de manière linéaire (conditions initiales, vitesse constante), puis la vitesse va diminuer jusqu'à devenir nulle.

## 3. La variation d'absorbance dans les conditions initiales

### 3.1. Définition du coefficient d'absorption molaire et relation avec l'absorbance

Le coefficient d'absorption molaire (noté  $\epsilon_M$ ) est l'absorbance (théorique) d'une solution à la concentration de  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  lue dans une cuve de 1 cm de trajet optique à la longueur d'onde considérée, ici 340 nm.

Ce coefficient d'absorption molaire est le coefficient directeur de la droite obtenue en représentant l'absorbance en fonction de la concentration (cuve de 1 cm de trajet optique).

La relation entre absorbance et concentration est celle de la loi de Beer - Lambert :

$$A = \epsilon_M \cdot C \cdot l$$

dans laquelle : A est l'absorbance exprimée en unités d'absorbance ;

C est la concentration en  $\text{mol.L}^{-1}$  de solution absorbante (solution dans la cuve, solution de lecture) ;

l est le trajet optique en cm ;

$\epsilon_M$  est le coefficient d'absorption molaire en  $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2. Calcul de la quantité de NADH + H<sup>+</sup> transformée en une minute

L'application de la loi de Beer - Lambert permet de calculer la concentration du NADH formé par minute, exprimée en moles par litre de solution de lecture, à savoir :

$$C = 0,048 / (6300 \cdot 1) \text{ mol NADH . (L de solution de lecture)}^{-1}$$

Or la cuve de lecture a un volume de 3 mL soit  $3 \cdot 10^{-3}$  L : la quantité Q de NADH transformée en une minute est alors,

$$Q = 0,048 \cdot 3 \cdot 10^{-3} / (6300 \cdot 1) \text{ mol NADH . min}^{-1} \cdot (3 \text{ mL})^{-1}$$

$$Q = 2,29 \cdot 10^{-8} \text{ mol NADH . min}^{-1} \cdot (3 \text{ mL})^{-1}$$

$$Q = 22,9 \text{ nmol NADH . min}^{-1} \cdot (3 \text{ mL})^{-1}$$

### 3.3. Calcul de l'activité spécifique de la préparation de LDH

Si  $2,29 \cdot 10^{-8}$  moles de NADH sont produites par minute pour les 3 mL de la cuve de lecture, cette quantité correspond à 50  $\mu\text{L}$  (0,050 mL) de préparation de LDH.

Si l'on était parti de 1 mL de préparation de LDH, la quantité produite serait :

$2,29 \cdot 10^{-8} \cdot 1 / 0,050$  moles de NADH + H<sup>+</sup> par minute et par mL de préparation de LDH,

soit  $0,458 \cdot 10^{-6}$  moles de NADH + H<sup>+</sup> par minute et par mL de préparation de LDH,

soit  $0,458 \cdot 10^{-6}$  moles de pyruvate transformé par minute et par mL de préparation de LDH,

soit 0,458 UI par mL de préparation de LDH.

Or, la concentration en protéines est de  $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  de préparation de LDH (voir question 1).

L'activité spécifique AS est donc :

$$AS = 0,458 / 1,2 = 0,38 \text{ UI par mg de préparation de LDH}$$

## Exercice 24 La lactate déshydrogénase (LDH) au laboratoire de biochimie

### 1. Détermination de l'activité de la lactate déshydrogénase

1.1. Droite décroissante du fait de l'utilisation du NADH. Equation : Absorbance =  $-0,0153 \cdot t$  (en min.) + 0,378

1.2. Au bout d'un certain temps, la pente de la droite s'infléchirait, traduisant une diminution de la vitesse de la réaction enzymatique liée à la diminution de la concentration en substrat.

1.3. Activité de la LDH :

$$CAC = \frac{\Delta A \cdot V_i}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot l \cdot V_e}$$

avec  $V_i$  = volume de milieu réactionnel

et  $V_e$  = volume de prise d'essai

$$\text{Applications numériques : } CAC = \frac{0,0153 \cdot 3,15 \cdot 10^5}{6300 \cdot 1 \cdot 0,1} = 76,5 \text{ UI.mL}^{-1}$$

$$CAC = \frac{0,0153 \cdot 3,15}{60 \cdot 6300 \cdot 1 \cdot 0,1 \cdot 10^{-5}} = 1,28 \cdot 10^{-3} \text{ kat.L}^{-1}$$

### 2. Dosage enzymatique de l'acide lactique

2.1. Dosage enzymatique de substrat en point final.

2.2. La réaction (2) permet de rendre la réaction (1) totale. Acide glutamique (à  $45 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans le milieu réactionnel) en large excès par rapport à l'acide lactique à doser (limite de linéarité :  $0,2 \text{ mmol}$  d'acide lactique par litre de milieu réactionnel).

2.3. Sens de variation de l'absorbance et intérêt de mesurer  $A_{1T}$  et  $A_{2T}$ .

- Les réactions conduisent à la formation de NADH absorbant à 340 nm → augmentation de l'absorbance.

-  $A_{1T}$  et  $A_{2T}$  représentent l'absorbance des témoins permettant de soustraire l'absorbance lue pour les réactifs de l'absorbance lue pour la réaction. La différence  $A_{2T} - A_{1T}$  doit être la plus faible possible, elle témoigne de la stabilité des réactifs.

2.4. Concentration massique en acide lactique

- Formule littérale : utilisation de la loi de Beer Lambert  $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

$$C_{(MR)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l} \quad \text{en mol.L}^{-1} \text{ de milieu réactionnel (avec } \epsilon \text{ en L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ et } l \text{ en cm)}$$

$$C_{(échantillon)} = \frac{\Delta A \cdot V_1 \cdot f}{\epsilon \cdot l \cdot V_e} \quad \text{en mol.L}^{-1} \text{ d'échantillon}$$

avec  $V_1$  = volume de milieu réactionnel

$V_e$  = volume de prise d'essai d'échantillon

$f$  = facteur dilution de l'échantillon.

$$\rho_{(échantillon)} = \frac{\Delta A \cdot V_1 \cdot M_{\text{lactate}} \cdot f}{\epsilon \cdot l \cdot V_e}$$

$$\rho_{(échantillon)} = \Delta A \times K \quad \text{avec} \quad K = \frac{V_1 \cdot M_{\text{lactate}} \cdot f}{\epsilon \cdot l \cdot V_e} \quad \text{soit} \quad K = \frac{2,24,90,1,100}{6300,1,0,1} = 32,04$$

- Application numérique  $\rho$  (en g.L<sup>-1</sup>) =  $\Delta A \cdot K$  avec  $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$

$$\rho = [(0,539 - 0,146) - (0,213 - 0,150)] \cdot 32,04 = 10,6 \text{ g.L}^{-1}$$

### Exercice 25 Détermination de la CAC de la créatine kinase (CK)

1. La succession des réactions est la suivante :



Les réactions sont respectivement dénommées : principale, intermédiaire et indicatrice.

2. L'enzyme testée est la CK et le suivi s'effectue au niveau de la réaction indicatrice. Le processus comportant trois étapes, c'est l'étape lente qui impose sa cinétique à l'ensemble. L'étape lente est donc la réaction catalysée par la CK, bien que sa cinétique soit d'ordre 0 par rapport à ses substrats.

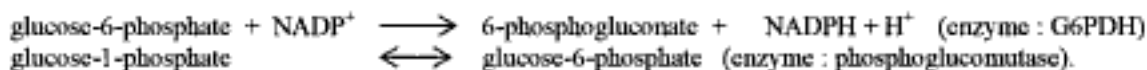
Les réactions intermédiaire et indicatrice doivent être instantanées, ce que l'on obtient en utilisant des concentrations en glucose et NADP<sup>+</sup> importantes, ainsi que bon nombre d'unités enzymatiques pour HK et G6PDH. La réaction intermédiaire est d'ordre 1 par rapport à l'ATP et la réaction indicatrice d'ordre 1 par rapport au glucose-6-phosphate.

3. Le mélange réactionnel est le suivant : créatine-phosphate, ADP, glucose, NADP<sup>+</sup>, HK et G6PDH le tout dans un tampon adéquat.

$$4. \quad CAC = \frac{(0,1 / 5) \cdot 10^6 \cdot 2,6}{6300,0,1} = 82,5 \text{ UI.L}^{-1} \text{ ou encore } 82,5 \cdot 10^6 / 60 \text{ soit } 1,375 \cdot 10^6 \text{ kat.L}^{-1}$$

### Exercice 26 Dosage d'un mélange de glucose-1-phosphate et de glucose-6-phosphate

1. Les réactions enzymatiques sont les suivantes :



Dans un premier temps, on dose le glucose-6-phosphate présent par une méthode en point final en mesurant le NADPH formé (les réactions se faisant mole à mole) et dans un deuxième temps, on transforme le glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate (à l'aide de la phosphoglucomutase), lequel est dosé comme précédemment.

$$2. \quad [\text{glucose-6-phosphate}] = \frac{0,470 \cdot 2,5}{6300 \cdot 1} = 1,86 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$[\text{glucose-phosphate total}] = \frac{0,600 \cdot 4,0}{6300 \cdot 1} = 3,81 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$[\text{glucose-1-phosphate}] = [\text{glucose-phosphate total}] - [\text{glucose-6-phosphate}] = 1,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

Remarque : pour le calcul de la [glucose-1-phosphate], il n'est pas possible d'appliquer la loi de Beer-Lambert à partir des différences d'absorbances (0,600 - 0,470), les 2 absorbances étant mesurées dans des volumes réactionnels différents (le volume de phosphoglucomutase ajouté pour doser le glucose-1-phosphate n'est pas négligeable par rapport au volume de la cuve lors du dosage du glucose-6-phosphate), sauf, par exemple, si l'on ramène par le calcul l'absorbance de 0,470 à 4 mL (volume de milieu réactionnel final lors de ce dosage), ce qui donne  $0,470 \cdot 2,5 / 4 = 0,294$ .

### Exercice 27 Utilisation de la glucokinase pour le dosage du glucose

- Pour la méthode en point final, on attend l'épuisement total du substrat pour la solution à doser. Le calcul de la concentration en glucose notée [glucose] dans le milieu réactionnel à doser s'effectue à partir de la loi de Beer-Lambert :

$$[\text{glucose}] = 0,570 / 6300 = 9,05 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

Il serait également possible de calculer la concentration en glucose à partir de l'absorbance finale et de la concentration de la solution étalon par un produit en croix.

$$[\text{glucose}] = \text{concentration de la solution étalon} \cdot A_{\text{finale sol. à doser}} / A_{\text{finale sol. étalon}}$$

- Pour la méthode des vitesses initiales, on évalue les vitesses initiales ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ ) pour la solution étalon et pour la solution à doser à partir des tangentes à l'origine, soit un  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  de 0,3 pour la solution à doser et un  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  de 0,2 pour la solution étalon. La loi de Beer-Lambert n'est pas utilisée, mais on est dans des conditions où  $v_i = k \cdot [S]$  (voir résumé du cours).

La concentration de la solution étalon étant de  $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $[\text{glucose}] = 0,7 \cdot 10^{-4} \cdot 0,3 / 0,2 = 1,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

- Pour la méthode dite cinétique non linéaire en temps fixé, on compare un  $\Delta A / \Delta t$  de la solution à doser à celui obtenu pour la solution étalon.

Il est possible de choisir  $\Delta t = 30$  secondes entre 1 minute et 1,5 minute. Pour la solution à doser, le  $\Delta A$  est d'environ 0,1 et pour la solution étalon environ 0,075, ce qui donne :

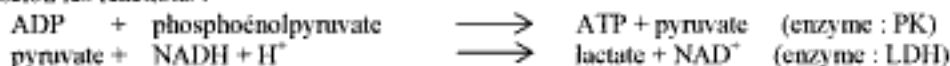
$$[\text{glucose}] = 0,7 \cdot 10^{-4} \cdot 0,1 / 0,075 = 9,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

Les différentes concentrations sont proches les unes des autres.

### Exercice 28 Dosages de l'AMP et de l'ADP dans le sang total

1. Il s'agit pour chacun de ces nucléotides d'un dosage en point final.

L'ADP est dosé selon les réactions :



La réaction catalysée par la LDH sert de réaction indicatrice, on apprécie le NADH consommé, ce qui correspond à l'ADP, tous les composés réagissant mole à mole.

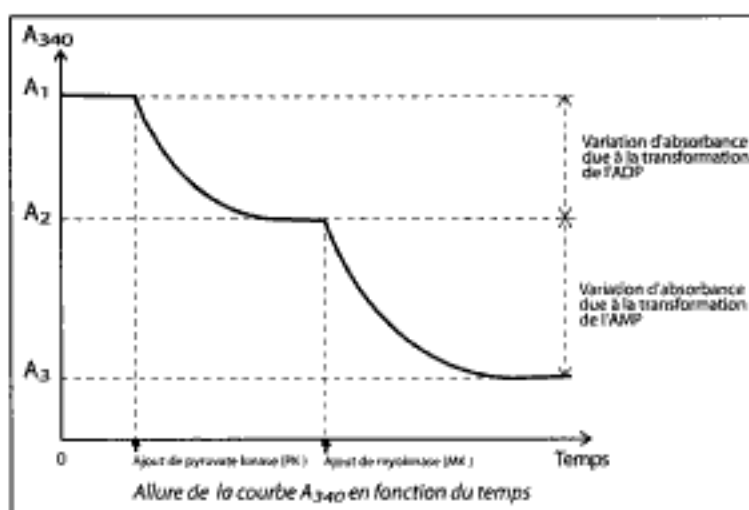
L'AMP est ensuite transformé en ADP selon la réaction :



L'ADP est ensuite dosé comme précédemment. Dans les calculs, il conviendra de ne pas oublier un facteur 2, puisque 1 AMP donne 2 ADP.

2. Le mélange réactif comporte le phosphoénolpyruvate et le NADH, le tout dans un tampon approprié. Compte tenu des concentrations habituelles en ADP et en AMP dans le sang, l'ATP ne devrait pas être limitant lors du dosage de l'AMP.

3. L'enregistrement susceptible d'être réalisé serait le suivant :



## 4. Calcul de la concentration en ADP.

Ce calcul s'effectue à partir de la loi de Beer-Lambert, sans oublier les dilutions effectuées lors de la filtration (5/6) et de la défécation (5/10). Le volume total de la cuve de spectrophotométrie peut être de 2,42 mL ou 2,44 mL, ce qui peut être considéré comme équivalent, compte tenu de la précision de la méthode.

$$[\text{ADP}] = \frac{(A_1 - A_2) \cdot 10^6 \cdot 2,44 \cdot 6 \cdot 10}{6300 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 5} = 465 \cdot (A_1 - A_2) \mu\text{mol.L}^{-1}$$

Le même type de raisonnement que précédemment est utilisé pour calculer la concentration en AMP :

$$[\text{AMP}] = \frac{(A_2 - A_3) \cdot 10^6 \cdot 2,46 \cdot 6 \cdot 10}{6300 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 5 \cdot 2} = 234 \cdot (A_2 - A_3) \mu\text{mol.L}^{-1}$$



## 6 - Bioénergétique

### 1. Principes de la thermodynamique d'équilibre

Tous les événements du monde biologique se réfèrent aux deux grands principes fondamentaux de la thermodynamique, à savoir :

- **premier principe** : l'énergie totale de l'univers est constante. Par énergie totale, on entend la somme de toutes les formes de travail et de chaleur ;
- **deuxième principe** : l'entropie de l'univers augmente. Par entropie, on entend le degré de désordre ou de hasard.

Remarques :

- en *thermodynamique*, on raisonne par rapport à un "système" (partie finie d'un ensemble matériel), en opposition avec le "milieu extérieur" ;
- en *bioénergétique*, le système peut être une cellule. Celle-ci échange énergie et matière avec le milieu extérieur ; il s'agit d'un système dit "ouvert", dont l'étude thermodynamique est complexe. On se contentera ici de la thermodynamique d'équilibre des systèmes dits "fermés", systèmes qui échangent de l'énergie avec le milieu extérieur, mais pas de matière. Ce type d'étude est suffisant pour expliquer bon nombre de phénomènes de bioénergétique ;
- pour décrire le contenu énergétique d'un système, on dispose d'équations d'état plus ou moins complexes. Pour les milieux biologiques, celles-ci sont plus simples du fait que la température, la pression et le volume restent constants ;
- la thermodynamique d'équilibre ne s'intéresse qu'à un état initial et à un état final. Lors d'une telle transition, la variation d'énergie du système doit être contrebalancée par une variation d'énergie inverse du milieu extérieur.

#### 1.1. Premier principe et énergie calorifique

Si on fournit de la chaleur "Q" à un système, il y a variation (augmentation) de son énergie interne "E" et/ou augmentation du travail "W" du système sur le milieu extérieur.

La conservation de l'énergie permet d'écrire l'équation :  $Q = \Delta E + W$  soit  $\Delta E = Q - W$ .

A pression constante, Q est également appelé **variation d'enthalpie** " $\Delta H$ ", d'où  $\Delta H = \Delta E + W$ . Si, de plus, le volume est constant, on a  $\Delta H = \Delta E$ .

$\Delta H$  se mesure aisément par calorimétrie directe. Par exemple, la réaction de combustion du glucose :



libère environ  $2800 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , donc  $\Delta H = -2800 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

Par convention, on affecte  $\Delta H$  d'un signe "-" pour indiquer que le système perd de l'énergie au profit du milieu extérieur. Les mêmes mesures peuvent s'effectuer pour différents types de réactions. L'expérience montre que les réactions de combustion sont bien plus énergétiques que d'autres types de réactions biochimiques comme les hydrolyses, les réactions de transfert, les isomérisations, ...

La cellule hétérotrophe, cellule devant obligatoirement disposer d'une source organique de carbone, tire d'ailleurs naturellement son énergie de réactions de type oxydo-réduction.

#### 1.2. Deuxième principe et entropie

Conformément au premier principe de la thermodynamique, une machine thermique peut fournir du travail à partir de la chaleur :  $W = Q \cdot ((T_2 - T_1) / T_2)$ , relation où  $T_1$  et  $T_2$  sont respectivement les températures d'une source froide et d'une source chaude.

La cellule hétérotrophe, quant à elle, ne peut fournir de travail à partir de chaleur, étant donné qu'elle fonctionne dans des conditions isothermes.

Le premier principe dit que l'énergie se conserve mais il ne peut expliquer tous les aspects des échanges d'énergie. Par exemple, lors d'une dialyse, les molécules diffusent d'un compartiment à forte concentration vers un compartiment à faible concentration, jusqu'à égalité des concentrations dans les deux compartiments. Le système évolue spontanément et irréversiblement vers un état de "hasard". On dit qu'il y a augmentation de l'**entropie** "S". L'entropie se définit alors comme un état désordonné incapable d'effectuer un travail.

En thermodynamique, on considère la **variation d'enthalpie libre** " $\Delta G$ " : il s'agit de la composante de l'énergie totale capable d'effectuer un travail dans des conditions isothermes. C'est l'énergie qui est utilisable, et ce contrairement à l'entropie, forme dégradée de l'énergie. La relation reliant  $\Delta G$  à la variation d'entropie "S" est la suivante :

Par convention, on affecte  $\Delta G$  d'un signe "-" pour indiquer que le système perd de l'énergie au profit du milieu extérieur.



$$\Delta G > 0$$

Le système gagne de l'énergie  
phénomène endergonique.



$$\Delta G < 0$$

Le système perd de l'énergie  
phénomène exergonique.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

avec :

$\Delta G$  : variation d'enthalpie libre du système en  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$  ;

$\Delta H$  : variation d'enthalpie du système en  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$  ;

T : température absolue en Kelvin (K) ;

$\Delta S$  : variation d'entropie du système en  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

## 2. Enthalpie libre, enthalpie libre standard et constante d'équilibre d'une réaction

- La survie d'une cellule nécessite un apport continu d'énergie. Cette énergie est nécessaire aux divers travaux cellulaires : travail mécanique, travail chimique, travail osmotique, ...
- Un système est la région de l'univers dans laquelle s'effectue(nt) la ou les transformation(s) que l'on étudie (cellule, vase réactionnel, ...).
- Du point de vue énergétique, le système peut fournir au milieu extérieur ou y puiser une certaine quantité d'énergie qu'on appelle **variation d'enthalpie libre du système** ( $\Delta G$ ).

### 2.1. Cas général

#### 2.1.1. Cas d'une réaction (bio)chimique



On peut définir, pour la réaction considérée de gauche à droite et à pression constante, une variation d'enthalpie libre du système en évolution :

$$\Delta G = \Delta G_o + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]_i^\gamma [D]_i^\delta}{[A]_i^\alpha [B]_i^\beta}$$

- avec :
- $\Delta G$  : variation d'enthalpie libre en  $J \cdot mol^{-1}$  ;
  - $\Delta G_o$  : variation d'enthalpie libre standard en  $J \cdot mol^{-1}$  ;  
(conditions standard : concentration initiale des réactants égale à  $1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ , température 298 K) ;
  - R : constante des gaz parfaits,  $8,32 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot K^{-1}$  ;
  - T : température en Kelvin (t en  $^{\circ}C + 273$ ) ;
  - $[A]_i$ ,  $[B]_i$ ,  $[C]_i$  et  $[D]_i$  : concentrations molaires initiales des réactants, en  $\text{mol} \cdot L^{-1}$ .

- Lorsque :

- $\Delta G > 0$  : la réaction est dite "**endergonique**", elle est thermodynamiquement défavorisée (il faut lui fournir de l'énergie pour qu'elle ait lieu) ;
- $\Delta G = 0$  : la réaction est à l'**équilibre** (système fermé) ou à l'**état stationnaire** (système ouvert) ;
- $\Delta G < 0$  : la réaction est dite "**exergonique**", elle est thermodynamiquement favorisée (elle libère de l'énergie).

- A l'équilibre  $\Delta G = 0$  donc :

$$\Delta G_o = - R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]_e^\gamma [D]_e^\delta}{[A]_e^\alpha [B]_e^\beta}$$

Avec :  $[A]_e$ ,  $[B]_e$ ,  $[C]_e$  et  $[D]_e$  : concentrations molaires à l'équilibre des réactants exprimées en  $\text{mol} \cdot L^{-1}$ .  
Or la constante d'équilibre K pour la réaction considérée de gauche à droite est définie par la relation :

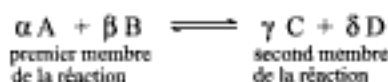
$$K = \frac{[C]_e^\gamma \cdot [D]_e^\delta}{[A]_e^\alpha \cdot [B]_e^\beta} \quad \text{donc} \quad \Delta G_o = - R \cdot T \cdot \ln K$$

Prévision du sens des réactions d'après la valeur de  $\Delta G_o$  :

$\Delta G_o$   
en  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

- ↑
- + 12,5 Réactions impossibles spontanément
  - Equilibre défavorable aux corps du second membre de la réaction
  - 0 Equilibre
  - Equilibre favorable aux corps du second membre de la réaction
  - 12,5 Réactions totales

mais



- prévision à partir de concentrations initiales molaires, ce qui est très éloigné des concentrations physiologiques d'où
- certaines réactions fonctionnent en fait dans le sens opposé à celui prévu par la seule considération de  $\Delta G_o$  ; il serait préférable d'utiliser  $\Delta G$ .

### 2.1.2. Cas d'une réaction (bio)chimique faisant intervenir des protons



La variation d'enthalpie libre, pour la réaction considérée de gauche à droite, peut également s'écrire :

$$\Delta G' = \Delta G_o' + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]_i^\gamma \cdot [D]_i^\delta}{[A]_i^\alpha \cdot [B]_i^\beta \cdot [H^+]_i^n}$$

soit 
$$\Delta G' = \Delta G_o' - 2,3 \cdot n \cdot R \cdot T \cdot \text{pH} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]_i^\gamma \cdot [D]_i^\delta}{[A]_i^\alpha \cdot [B]_i^\beta}$$

En posant : 
$$\Delta G_o'^* = \Delta G_o' - 2,3 \cdot n \cdot R \cdot T \cdot \text{pH}$$

on obtient :

$$\Delta G' = \Delta G_o'^* + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]_i^\gamma \cdot [D]_i^\delta}{[A]_i^\alpha \cdot [B]_i^\beta}$$

### 2.2. Cas des réactions d'oxydo-réduction

L'oxydo-réduction, consistant en un transfert d'électrons, c'est-à-dire de charges électriques, on conçoit qu'elle puisse donner naissance à une différence de potentiel (ddp).

Il a été vu précédemment (voir chapitre "Notions préliminaires") qu'un couple redox est susceptible de fournir ou de capter des électrons selon la réaction :



A ce couple redox correspond un potentiel "E" donné par la relation de Nernst (à condition qu'il n'y ait pas présence d'autres espèces ioniques) :

$$E = E_o' + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{[\text{ox}]^\beta}{[\text{red}]^\alpha}$$

- avec :
- E : potentiel redox en volts ;
  - E<sub>o</sub>' : potentiel standard redox ( potentiel redox dans les conditions chimiques standard) en volts ([Ox] = [Red] = 1 mol · L<sup>-1</sup> ; 298 K (25°C)) ;
  - R : constante des gaz parfaits = 8,32 J · mol<sup>-1</sup> · K<sup>-1</sup> ;
  - F : Faraday = 96500 J · V<sup>-1</sup> · mol<sup>-1</sup> ;
  - [ox] : concentration de la forme oxydée ;
  - [red] : concentration de la forme réduite.

En cas d'intervention de protons, la concentration en protons classiquement fixée à pH = 7, peut être extraite du deuxième membre de l'équation de Nernst et intégrée à E<sub>o</sub>'. De plus, en remplaçant R, T et F par leurs valeurs respectives et en substituant le logarithme décimal au logarithme népérien, l'équation de Nernst devient :

$$E' = E_o' + \frac{0,06}{n} \log \frac{[\text{ox}]^\beta}{[\text{red}]^\alpha}$$

Remarque : s'il n'y a pas d'intervention de protons dans l'équilibre redox, E' = E<sub>o</sub>'.

Lors d'une réaction d'oxydo-réduction, les électrons vont du couple ayant un potentiel donné vers un couple ayant un potentiel redox supérieur.

La variation du potentiel redox est liée à la variation d'enthalpie libre qui accompagne la réaction de la manière suivante :

$$\Delta G_o' = -n \cdot F \cdot \Delta E_o' \quad \text{ou} \quad \Delta G_o'^* = -n \cdot F \cdot \Delta E_o'^*$$

ou encore, dans des conditions non standard :

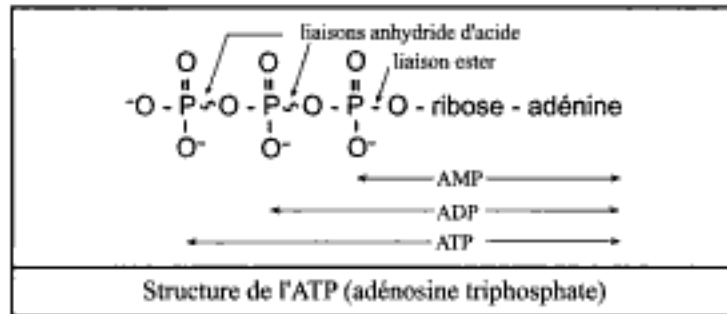
$$\Delta G' = -n \cdot F \cdot \Delta E'$$

Remarques :

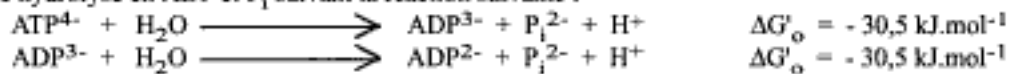
- dans l'expression précédente, la variation de potentiel est toujours positive (elle est égale au potentiel du couple oxydant diminué du couple du potentiel du couple réducteur) ;
- plus la variation de potentiel est importante, plus l'effet énergétique est grand en valeur absolue.

### 3. Principaux composés à haut potentiel d'hydrolyse et notion de couplage énergétique

- Les besoins énergétiques d'une cellule sont essentiellement fournis par l'oxydation (deshydrogénation) de substrats énergétiques. L'énergie de ces oxydations est "mise en réserve" dans des **composés à haut potentiel d'hydrolyse** (composés dont l'hydrolyse libère de l'énergie ( $\Delta G'_o < -30 \text{ kJ.mol}^{-1}$ )).
- Parmi ces composés l'adénosine triphosphate (ATP) tient une place prépondérante :



L'ATP peut être hydrolysé en ADP et  $P_i$  suivant la réaction suivante :



Remarque : autre hydrolyse possible, mais moins fréquente, en AMP et pyrophosphate ( $\text{PP}_i$ ).

Compléments :

- au pH cellulaire, l'ATP se trouve sous forme  $\text{ATP}^{4-}$  ; il y a donc une forte contrainte électrostatique au niveau de la molécule. Lors de son hydrolyse en ADP (hydrolyse d'une liaison anhydride phosphorique), par exemple, cette contrainte électrostatique diminue au niveau de l' $\text{ADP}^{3-}$  et il apparaît une répulsion au niveau des produits d'hydrolyse ( $\text{ADP}^{3-}$  et  $\text{P}_i^{2-}$ ), ceci donnant à la réaction un caractère d'irréversibilité ;

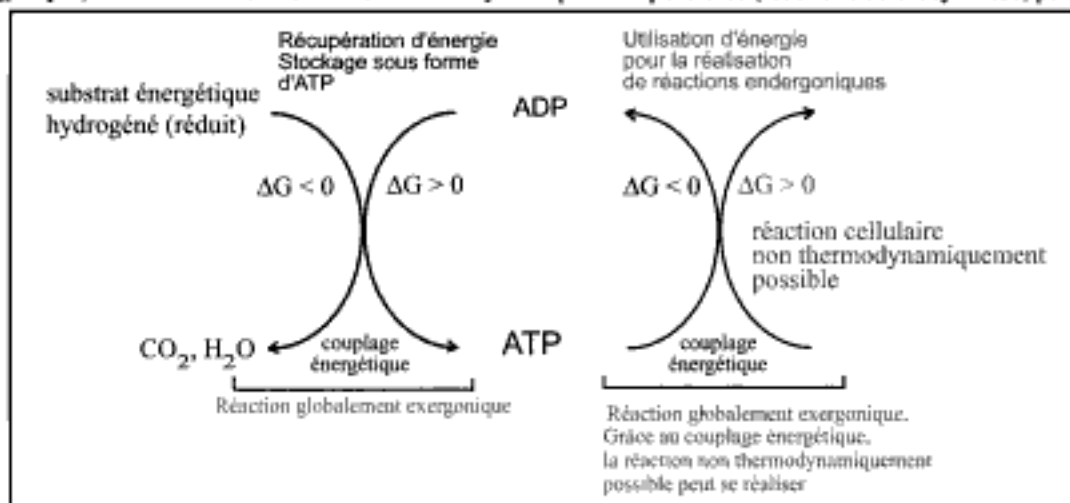
Ces caractéristiques ne se retrouvent pas lors de l'hydrolyse de la liaison ester se trouvant dans l'AMP ;

- les produits d'hydrolyse de l'ATP se stabilisent par résonance, ce qui accentue encore la différence de contenu énergétique entre l'ATP et ses produits d'hydrolyse.

- D'autres composés peuvent également assurer une fonction identique à celle de l'ATP :

| Forme phosphorylée      | Forme déphosphorylée | $\Delta G'_o$ ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ) |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------------|
| phosphoénolpyruvate     | pyruvate             | - 62                                   |
| 1,3-bisphosphoglycérate | 3-phosphoglycérate   | - 55                                   |
| phosphocréatine         | créatine             | - 43                                   |
| ATP                     | ADP                  | - 30,5                                 |
| ADP                     | AMP                  | - 30,5                                 |

La forte valeur de la variation de l'enthalpie libre des composés à haut potentiel d'hydrolyse permet, grâce au **couplage énergétique**, les réactions cellulaires non thermodynamiquement possibles (réactions de biosynthèse, par exemple) :



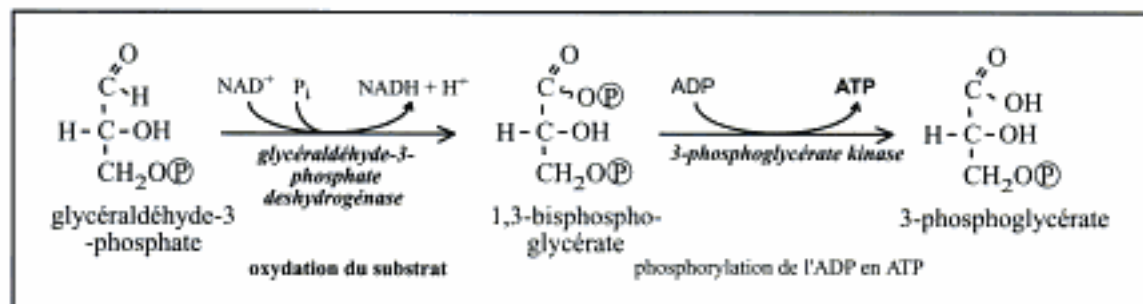
## 4. Formation de composés à haut potentiel d'hydrolyse, exemples

L'énergie dégagée lors de l'oxydation de divers substrats énergétiques est stockée sous forme d'ATP par **phosphorylation de l'ADP**. Cette phosphorylation se réalise :

- au cours de la réaction d'oxydation ou immédiatement après : phosphorylation au niveau du substrat ;
- lors d'un transfert transmembranaire de protons liés à l'oxydation de substrats ; le mécanisme le plus classique est celui de la phosphorylation oxydative qui se déroule dans la chaîne respiratoire mitochondriale des eucaryotes.

### 4.1. Synthèse d'ATP par phosphorylation liée au substrat

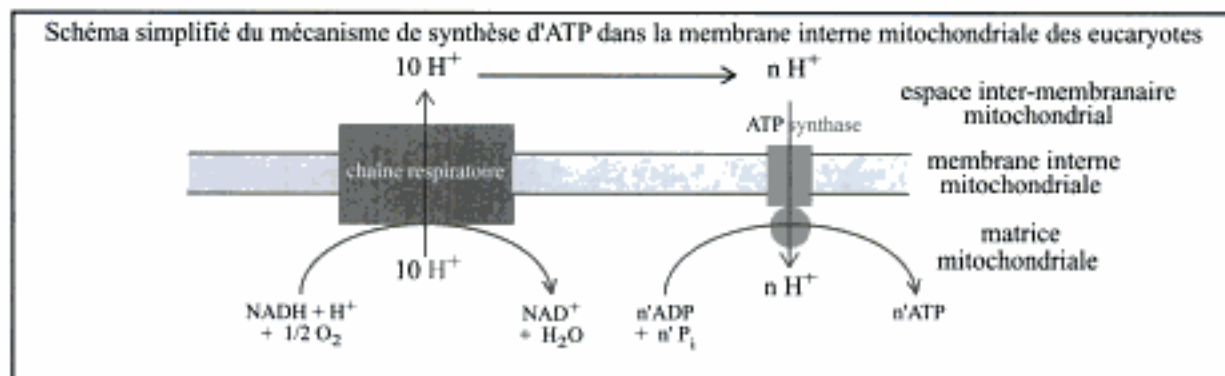
Exemple de la réaction catalysée par la 3-phosphoglycérate kinase lors de la glycolyse :



Bilan énergétique de la réaction d'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 3-phosphoglycérate : en considérant les couples redox  $\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$  et  $3\text{-phosphoglycérate} / \text{glycéraldéhyde-3-phosphate}$ ,  $\Delta E^{\circ} = -0,57 - (-0,32) = +0,25 \text{ V}$ , ce qui correspond à un  $\Delta G^{\circ}$  d'environ  $-50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ceci permet la synthèse d'une mole d'ATP à partir d'une mole d'ADP lors de l'oxydation d'une mole de glycéraldéhyde-3-phosphate.

### 4.2. Synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative

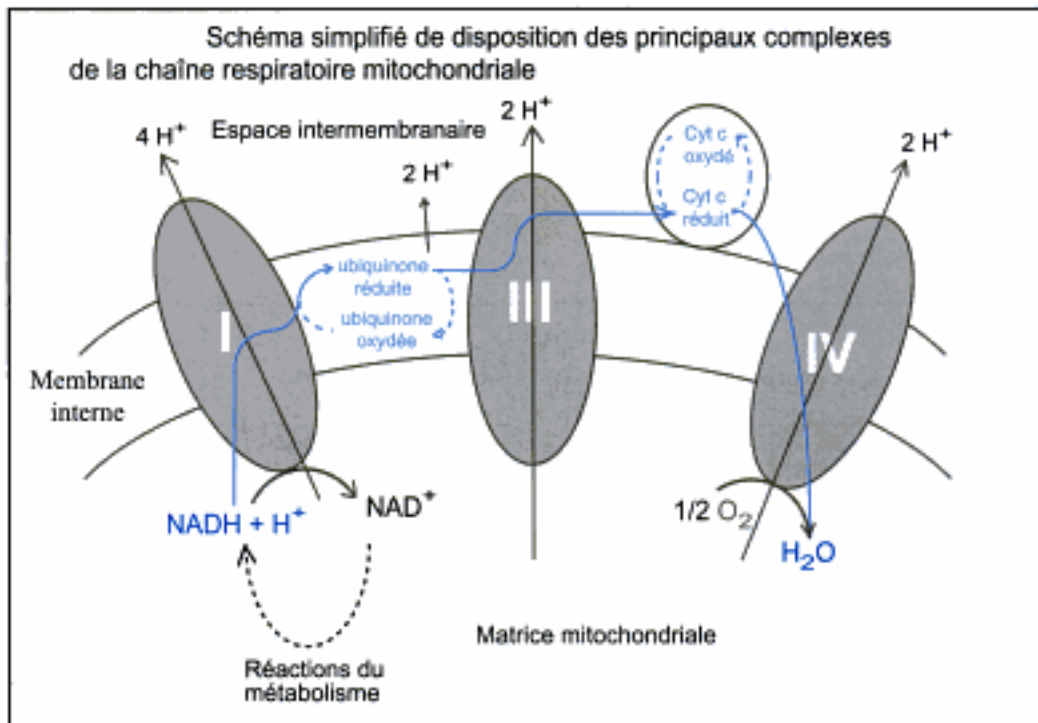
La chaîne respiratoire est un ensemble de structures impliquées dans des processus d'oxydoréduction. Sa fonction principale est de réoxyder, aux dépens de l'oxygène moléculaire de l'air, les coenzymes réduits produits lors des catabolismes cellulaires. Cette réoxydation s'accompagne d'une formation d'ATP qui est alors appelée "synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative".



L'oxydation mitochondriale du NADH ( $\Delta G < 0$ ) est couplée à un transport actif de protons de la matrice mitochondriale vers le cytosol ( $\Delta G > 0$ ). L'élément de couplage est la chaîne respiratoire localisée dans la membrane interne des mitochondries. Le transport actif de protons crée une différence de potentiel électrochimique du proton (élevé dans le cytosol, faible dans la matrice).

Dans un deuxième temps, la diffusion spontanée des protons du cytosol vers la matrice dans le sens des potentiels électrochimiques décroissants ( $\Delta G < 0$ ) est couplée à la phosphorylation d'ADP en ATP dans la matrice mitochondriale ( $\Delta G > 0$ ). L'élément de couplage est l'ATP synthase localisée dans la membrane interne mitochondriale.

### 4.3. Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale



La chaîne respiratoire (mitochondriale) est constituée de trois complexes enzymatiques principaux :

- **complexe I** : *NADH-ubiquinone réductase*. Le bilan réactionnel s'écrit :  
 $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{ubiquinone} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{ubiquinol}$   $\Delta E'_{\text{O}} = +0,36 \text{ V}$  et  $\Delta G'_{\text{O}} = -70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
- **complexe III** : *ubiquinol-cytochrome c réductase*. Le bilan réactionnel s'écrit :  
 $\text{ubiquinol} + 2 \text{ cytochrome c (Fe}^{2+}) \rightarrow \text{ubiquinone} + 2 \text{ cytochrome c (Fe}^{3+})$   
 $\Delta E'_{\text{O}} = +0,21 \text{ V}$  et  $\Delta G'_{\text{O}} = -40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
- **complexe IV** : *cytochrome c oxydase*. Le bilan réactionnel s'écrit :  
 $2 \text{ cytochrome c (Fe}^{3+}) + 1/2 \text{ O}_2 \rightarrow 2 \text{ cytochrome c (Fe}^{2+}) + \text{H}_2\text{O}$   $\Delta E'_{\text{O}} = +0,47 \text{ V}$  et  $\Delta G'_{\text{O}} = -110 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

L'ensemble représente une énergie de  $-220 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . La cellule récupère  $3 \cdot 30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , soit à peu près 40 % de l'énergie libérée, ceci en considérant l'état standard. Ceci serait à moduler en fonction des différentes concentrations cellulaires en métabolites.

*Remarque* : le **complexe II** est la *succinate-ubiquinone réductase*. Le  $\text{FADH}_2$  de la succinate deshydrogénase cède directement ses électrons à l'ubiquinone, compte tenu des valeurs de potentiels redox. Dans ce cas, le  $\Delta G'_{\text{O}}$  est insuffisant pour qu'il y ait transport actif de protons. La réoxydation du  $\text{FADH}_2$  s'accompagne alors de la synthèse de seulement 2 ATP.

### 4.4. Rapport P / O

Le bilan énergétique s'exprime également en rapport P / O, rapport du nombre de moles d'ATP formées (P) au nombre de moles d'atomes d'oxygène consommés. Il est d'environ 3 quand le donneur d'électrons est le NADH. Il n'est que de 2 si les électrons sont injectés au niveau du complexe II.

### 4.5. Bilan de l'oxydation complète du glucose (dégradation en CO<sub>2</sub> de H<sub>2</sub>O)

Il est possible d'effectuer un bilan énergétique de la dégradation du glucose. L'oxydation complète d'une mole de glucose conduit à la formation :

- \* de 2 moles d'ATP au cours de la glycolyse ;
- \* de 10 moles de NADH ;
- \* de 2 moles de  $\text{FADH}_2$ .

La réoxydation des coenzymes dans la chaîne respiratoire donne :

$$10 \cdot 3 + 2 \cdot 2 = 34 \text{ moles d'ATP soit au total } 36 \text{ moles d'ATP.}$$

Dans des conditions standard, cela représente environ une **récupération de :**

**$36 \cdot 30,5$  soit  $1098 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  sur les  $2800 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  correspondant à la combustion complète d'une mole de glucose, soit un rendement d'environ 40 %.**

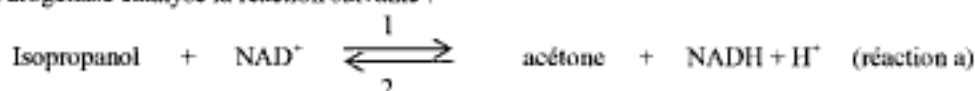
*Remarque* : dans ce bilan, il n'a pas été tenu compte de la scission du succinyl-CoA dans le cycle de Krebs.

## Énoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

### Exercice 1 Potentiel standard chimique et potentiel standard biochimique

1. L'alcool déshydrogénase catalyse la réaction suivante :



1.1. La constante d'équilibre "K" de la réaction "a" à 25 °C prise dans le sens 1 est égale à  $7,19 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Calculer la variation d'enthalpie libre standard " $\Delta G_{\text{int}}$ " de la réaction "a" prise dans le sens 1 à une température de 25 °C.

Donnée :  $R = 8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ .

1.2. Quel est le sens de la réaction "a" thermodynamiquement favorisé à l'état standard ?

2. La variation d'enthalpie libre standard " $\Delta G_{\text{ob}}$ " de la réaction "b" ci-après :



2.1. Calculer la variation d'enthalpie libre standard de la réaction d'hydrogénation du  $\text{NAD}^+$ , sachant que la réaction "a" peut être considérée comme étant la somme de 2 réactions à préciser.

2.2. Calculer le potentiel standard chimique du couple  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  noté  $E_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH})$ .

Donnée :  $F = 96500 \text{ C}$  ou  $\text{J.V}^{-1}.\text{K}^{-1}$ .

2.3. Calculer le potentiel standard biochimique (à  $\text{pH} = 7$ ) de ce même couple ( $E'_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH})$ ).

2.4. En se référant à la réaction d'hydrogénation du  $\text{NAD}^+$ , quel est l'intérêt pour le biochimiste d'utiliser  $E'_0$  plutôt que  $E_0$  ?

Donnée : le potentiel standard à  $\text{pH} = 7$  du couple  $2 \text{H}^+ / \text{H}_2$  est de  $-0,420 \text{ V}$ .

### Exercice 2 Chaîne de transporteurs d'électrons

Une chaîne de transporteurs d'électrons comporte 5 transporteurs d'électrons notés "a", "b", "c", "d" et "e". En présence d'un substrat donneur de protons et d'électrons ainsi que de dioxygène, 3 inhibiteurs notés "X", "Y" et "Z" bloquent le transfert des électrons en donnant soit les formes à 100 % oxydées (notées "+"), soit les formes à 100 % réduites (notées "-") des transporteurs.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous :

| Inhibiteurs | a | b | c | d | e |
|-------------|---|---|---|---|---|
| X           | + | + | - | + | + |
| Y           | - | - | - | + | + |
| Z           | - | - | - | + | - |

Donner l'ordre d'intervention des divers transporteurs, sachant que  $E'_{0b}$  est supérieur à  $E'_{0e}$ .

### Exercice 3 Bioénergétique chez une bactérie dénitrifiante

La bactérie dénitrifiante dont il est question est anaérobie stricte. Elle possède néanmoins une chaîne de transporteurs d'électrons, lui permettant de "respirer" (respiration nitrate). L'accepteur final d'électrons, au lieu d'être le dioxygène comme en aérobiose, est l'ion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) qui est réduit en ion nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). Les électrons sont introduits dans la chaîne de transporteurs par l'intermédiaire de NADH.

1. Ecrire l'équation bilan de la respiration nitrate.

2. Calculer la variation d'enthalpie libre standard  $\Delta G'_0$  correspondante.

3. La respiration nitrate est-elle plus ou moins énergétique que la respiration en aérobiose ? Justifier la réponse par un calcul.

Données :

- Potentiels redox :

$$E'_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH}) = -0,32 \text{ V}$$

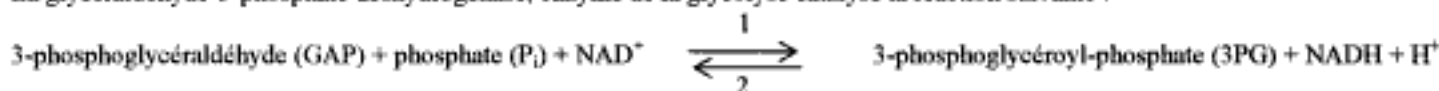
$$E'_0 (\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}) = +0,81 \text{ V}$$

$$E'_0 (\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-) = +0,42 \text{ V}$$

-  $F = 96500 \text{ C}$

**Exercice 4** Etude de la réaction catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, enzyme de la glycolyse catalyse la réaction suivante :



1. Les potentiels standard biochimiques (30 °C, pH = 7) des 2 couples redox sont les suivants :



1.1. Dans quel sens évolue la réaction catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ? La réaction est-elle facilement réversible ?

1.2. Calculer la variation d'enthalpie libre standard  $\Delta G'_0$  ainsi que la constante d'équilibre  $K'$  en considérant le sens thermodynamiquement favorisé.

Données :  $F = 96500 \text{ C}$  et  $R = 8,32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ .

2. Dans quel sens évolue la réaction dans les conditions de concentrations suivantes :  $[\text{GAP}] / [\text{3PG}] = 100$ ,  $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}] = 200$ ,  $[\text{P}_i] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ?

2.1. En raisonnant sur les potentiels redox à pH = 7 ( $E'$ ).

2.2. En raisonnant sur la variation d'enthalpie libre ( $\Delta G'$ ).

2.3. En raisonnant sur la constante d'équilibre ( $K'$ ).

**Exercice 5** Utilisation cellulaire du glucose

La phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (glucose-6-P) est la première étape de l'utilisation cellulaire du glucose au cours de la glycolyse ou voie de Embden-Meyerhof.

1. Phosphorylation directe du glucose

1.1. L'équation de la réaction de phosphorylation directe du glucose est la suivante :



Le  $\Delta G'_{01}$  de cette réaction est égal à  $+13800 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$  à 37 °C. Calculer la constante d'équilibre  $K'_1$  de la réaction. Commenter la valeur obtenue.

Donnée :  $R = 8,32 \text{ J}\cdot\text{mol}\cdot\text{K}^{-1}$ .

1.2. Dans le globule rouge (érythrocyte), les concentrations à l'état stationnaire (à l'équilibre) du glucose sont de  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , celle du glucose-6-P de  $83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et celle de  $\text{P}_i$  de  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Dans ces conditions de concentrations, la phosphorylation directe du glucose est-elle thermodynamiquement envisageable ?

2. Couplage réactionnel avec l'hydrolyse de l'ATP

2.1. Dans l'érythrocyte, la phosphorylation du glucose s'effectue en réalité par couplage avec l'hydrolyse de l'ATP. Ecrire l'équation bilan de ce couplage réactionnel. Calculer le  $\Delta G'_{02}$  correspondant à l'équation bilan, sachant qu'à l'hydrolyse d'une mole l'ATP en ADP correspond un  $\Delta G'_{03}$  de  $-30500 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$  à 37 °C. Commenter la valeur obtenue.

2.2. Mêmes questions que précédemment, mais dans les conditions des concentrations au niveau de l'érythrocyte.

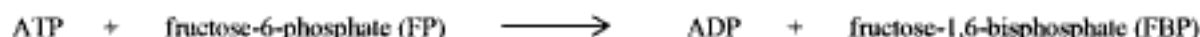
Données : les concentrations érythrocytaires en ATP et ADP sont respectivement égales à  $1850$  et  $138 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

2.3. La réaction correspondant à l'équation bilan (question 2.1.) peut être catalysée par la glucokinase ou l'hexokinase. L'intervention de l'une ou l'autre des deux enzymes modifie-t-elle les caractéristiques thermodynamiques des réactions catalysées ?

2.4. Lors de la néoglucogénèse, la cellule animale peut mettre du glucose en réserve sous forme de glycogène. Dans ce cas, le passage glucose-6-P en glucose est alors obligatoire. Peut-il s'effectuer par la réaction inverse de celle envisagée à la question 2.1. ?

**Exercice 6** Réaction catalysée par la phosphofructokinase (PFK)

La PFK catalyse la réaction suivante :



avec une variation d'enthalpie libre standard à pH = 7 de  $-14,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  à 37 °C.

Les concentrations des différents réactants à l'état stationnaire (à l'équilibre) dans l'érythrocyte sont les suivantes (toutes les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) :  $[\text{ATP}] = 1850$ ,  $[\text{FP}] = 14$ ,  $[\text{ADP}] = 138$  et  $[\text{FBP}] = 31$ .

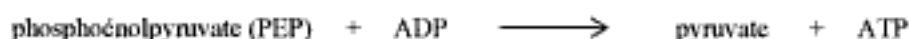


Les conditions de concentration dans l'érythrocyte à l'état stationnaire sont-elles compatibles avec celles prévues par le calcul de la constante d'équilibre  $K'$  ? Justifier et commenter la réponse.

Donnée :  $R = 8,32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ .

### Exercice 7 Réaction catalysée par la pyruvate kinase (PK)

La pyruvate kinase (PK) catalyse la réaction suivante :



Cette réaction présente une variation d'enthalpie libre standard  $\Delta G'_0$  à  $37^\circ\text{C}$  et à  $\text{pH} = 7$  égale à  $-31400 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Il s'agit de la dernière réaction de la glycolyse et de la troisième réaction irréversible de cette voie métabolique.

Dans certaines conditions physiologiques, le pyruvate peut être le point de départ d'une resynthèse de glucose lors de la néoglucogénèse, par exemple lors d'un effort musculaire intense accompagné de formation de lactate pouvant servir de source de pyruvate.

Quelle devrait être la concentration physiologique en pyruvate pour inverser le sens de la réaction catalysée par la PK ? Que penser de la concentration obtenue ?

Données :

- pour les différents réactants, on prendra les concentrations physiologiques rencontrées au niveau de l'érythrocyte exprimées en  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , soit :  $[\text{PEP}] = 23$ ,  $[\text{ADP}] = 138$ ,  $[\text{ATP}] = 1850$  ;
- la constante des gaz parfaits  $R = 8,32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ .

### Exercice 8 Force protomotrice

La variation d'enthalpie libre " $\Delta G$ " quantifiant le transport d'une molécule ou d'un ion d'un compartiment (1) à un compartiment (2) à travers une membrane lipidique, s'écrit :

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{[X_2]}{[X_1]} \right) + z \cdot F \cdot (\psi_2 - \psi_1) \quad (\text{équation " a "})$$

équation où  $R$  est la constante des gaz parfaits,  $T$  la température absolue,  $[X_1]$  et  $[X_2]$  les concentrations de la molécule ou de l'ion dans les compartiments 1 et 2,  $z$  la charge s'il s'agit d'un ion,  $F$  le faraday et  $\psi_1$  et  $\psi_2$  les potentiels électriques respectifs des compartiments 1 et 2.

Remarque : l'équation " a " indique que la variation d'enthalpie libre est la somme des variations d'énergie chimique et d'énergie électrique.

1. Dans la mitochondrie de la cellule animale, lors de la respiration cellulaire, il y a (selon la théorie de Mitchell) expulsion de protons vers l'extérieur de la membrane mitochondriale et création d'un gradient de protons à l'origine d'une force protomotrice. Cette force protomotrice est alors utilisable pour la synthèse d'ATP à partir d'ADP.

1.1. Modifier l'équation " a " pour faire apparaître dans l'expression de  $\Delta G$  de la force protomotrice, le gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) formé suite à l'expulsion des protons.

N.B. : la force protomotrice résulte de l'annulation du gradient de protons précédemment évoqué, c'est à dire du passage des protons de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie ; les indices " 1 " de l'équation " a " seront remplacés par des indices " ex " (comme extérieur) et les indices " 2 " seront notés " in " (comme intérieur).

1.2. Mitchell a indiqué que le gradient de pH mitochondrial est de l'ordre de 1 unité et que le potentiel transmembranaire est d'environ 150 mV (négatif à l'intérieur).

La variation d'enthalpie libre accompagnant le transfert de 2 moles de protons de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie est-il suffisant pour réaliser la synthèse d'une mole d'ATP à partir d'une mole d'ADP à  $37^\circ\text{C}$  ?

Données : -  $R = 8,32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  ;

-  $F = 96500 \text{ C}$  ;

- la réaction  $\text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{ATP}$  a un  $\Delta G'_0 = +30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  et un  $\Delta G'$  de l'ordre de  $+50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  dans les conditions de concentrations cellulaires.

2. La force protomotrice est également envisagée chez des bactéries comme *E. coli*. Elle permet d'expliquer thermodynamiquement le passage actif (contre un gradient de concentration) de certains métabolites, comme le lactose.

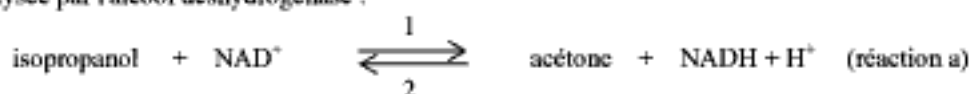
2.1. Calculer la variation d'enthalpie libre accompagnant le transfert d'une mole de proton de l'extérieur vers l'intérieur chez *E. coli* (force protomotrice), sachant que l'on peut mettre en évidence expérimentalement un  $\Delta\text{pH} = 2$  unités et un potentiel transmembranaire de 70 mV (négatif à l'intérieur) à  $37^\circ\text{C}$ .

2.2. Cette variation d'enthalpie libre est-elle suffisante pour permettre le passage d'une mole de lactose contre le gradient de concentration de lactose observé ? Donnée : la concentration en lactose intracellulaire est de 100 fois supérieure à celle de la concentration extracellulaire.

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Potentiel standard chimique et potentiel standard biochimique

1. Réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase :



1.1. Calcul de la variation d'enthalpie libre standard " $\Delta G_{0a1}$ " de la réaction "a" prise dans le sens 1 à 25 °C  
Dans le cas d'une réaction générale de type :



$$\text{on a } \Delta G = \Delta G_0 + R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{[\text{C}] \cdot [\text{D}]}{[\text{A}] \cdot [\text{B}]} \right)$$

expression où  $[\text{C}]$ ,  $[\text{D}]$ ,  $[\text{A}]$  et  $[\text{B}]$  sont les concentrations initiales des différents réactants. A l'équilibre,  $\Delta G = 0$ , donc

$$\Delta G_0 = -R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{[\text{C}_e] \cdot [\text{D}_e]}{[\text{A}_e] \cdot [\text{B}_e]} \right)$$

expression où  $[\text{C}_e]$ ,  $[\text{D}_e]$ ,  $[\text{A}_e]$  et  $[\text{B}_e]$  sont les concentrations des différents réactants à l'équilibre. Au final, on a donc :

$$\Delta G_0 = -R \cdot T \cdot \ln K$$

Il s'en suit que  $\Delta G_{0a1} = -R \cdot T \cdot \ln K$ , d'où  $\Delta G_{0a1} = -8,32 \cdot 298 \cdot \ln 7,19 \cdot 10^{-9} = +46489 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$  soit  $+46,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

1.2. Sens de la réaction "a" thermodynamiquement favorisé à l'état standard

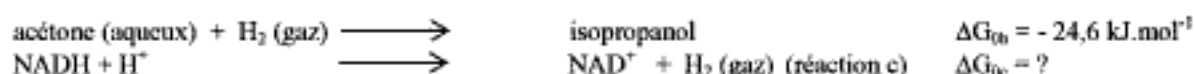
La valeur de  $K$  et le signe de  $\Delta G_{0a1}$  montrent que le sens thermodynamiquement favorisé est le sens 2 ; la réaction s'écrit alors (dans les conditions standard chimiques) :



2. Caractéristiques thermodynamiques du couple  $\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$

2.1. Calcul de la variation d'enthalpie libre standard de la réaction d'hydrogénation du  $\text{NAD}^+$

La réaction "a" prise dans le sens 2 peut se décomposer en 2 réactions de la manière suivante :



$$\text{On a : } \Delta G_{0a2} = \Delta G_{0b} + \Delta G_{0c} \text{ ou } \Delta G_{0c} = \Delta G_{0a2} - \Delta G_{0b}$$

$$\Delta G_{0c} = -46,5 - (-24,6) = -21,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

La réaction "c" écrite ci-dessus est l'inverse de la réaction d'hydrogénation de  $\text{NAD}^+$ , donc la variation d'enthalpie libre standard de la réaction d'hydrogénation du  $\text{NAD}^+$  est de  $+21,9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Elle est donc endothermique dans les conditions standard chimiques.

2.2. Calcul du potentiel standard chimique du couple  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  ( $E_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH})$ )

La réaction "c" peut, à son tour, se décomposer en :



$$\text{On a } \Delta G_{0c} = -n \cdot F \cdot \Delta E_0 \text{ d'où } \Delta E_0 = -\Delta G_{0c} / (n \cdot F)$$

$$\Delta E_0 = -(-21900) / (2 \cdot 96500) = +0,113 \text{ V}$$

Dans notre cas, compte tenu du signe de  $\Delta G_{0c}$ , le couple  $(2\text{H}^+ / \text{H}_2)$  est le couple oxydant et le couple  $(\text{NAD}^+ / \text{NADH})$  est le couple réducteur.

$$\Delta E_0 = E_0 (2\text{H}^+ / \text{H}_2) - E_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH}). \text{ Par convention } E_0 (2\text{H}^+ / \text{H}_2) = 0, \text{ donc } E_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH}) = -\Delta E_0$$

$$E_0 (\text{NAD}^+ / \text{NADH}) = -0,113 \text{ V.}$$

2.3. Calcul du potentiel standard biochimique (à pH = 7) du couple  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  ( $E'_{0(\text{NAD}^+/\text{NADH})}$ )

On a l'équation :



L'expression du potentiel est donnée par la relation de Nernst, soit :

$$E_{(\text{NAD}^+/\text{NADH})} = E'_{0(\text{NAD}^+/\text{NADH})} + 0,03 \cdot \log \left( \frac{[\text{NAD}^+] \cdot [\text{H}^+]^2}{[\text{NADH}] \cdot [\text{H}^+]} \right)$$

$$E_{(\text{NAD}^+/\text{NADH})} = E'_{0(\text{NAD}^+/\text{NADH})} + 0,03 \cdot \log \left( \frac{[\text{NAD}^+] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{NADH}]} \right)$$

A pH = 7, la concentration en protons  $[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  et on peut écrire

$$E'_0 = E_{0(\text{NAD}^+/\text{NADH})} + 0,03 \log [\text{H}^+]$$

$$E'_0 = -0,320 \text{ V}$$

2.4. Intérêt pour le biochimiste d'utiliser  $E'_0$  plutôt que  $E_0$

A pH = 7, le potentiel du couple  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  est supérieur à celui du couple  $2\text{H}^+ / \text{H}_2$  ; la réaction d'hydrogénation du  $\text{NAD}^+$  est maintenant thermodynamiquement favorisée, ce qui est conforme à la réalité biologique.

En bioénergétique, on fait souvent référence à l'état standard biochimique dans les calculs. Il s'agit d'une première approche car les conditions de concentrations cellulaires ne sont pas toujours connues. Celles-ci sont de toute manière très différentes de  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  et ne correspondent pas aux conditions de concentrations définies par la constante d'équilibre thermodynamique. Il convient donc d'être prudent dans l'utilisation des notions de bioénergétique et préférer raisonner sur les variations d'enthalpie libre  $\Delta G'$  que sur les variations d'enthalpie libre standard  $\Delta G'_0$ .

## Exercice 2 Chaîne de transporteurs d'électrons

- Les électrons vont du substrat donneur vers le dioxygène, par le biais de divers transporteurs.
- Les électrons vont d'un système ayant un potentiel donné vers un système ayant un potentiel plus élevé.
- Un inhibiteur interrompt le transfert des électrons. Les transporteurs situés en amont sont donc à 100 % réduits et les transporteurs situés en aval sont à 100 % oxydés.

Fort de ces indications, on en déduit l'ordre d'intervention des divers transporteurs, soit c, a, b, e et d.

## Exercice 3 Bioénergétique chez une bactérie dénitrifiante

1. Equation bilan de la respiration nitrate



2. Calcul de la variation d'enthalpie libre standard correspondante

On a  $\Delta G'_0 = -n \cdot F \cdot \Delta E'_0 = -n \cdot F \cdot (E'_{0(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-)} - E'_{0(\text{NAD}^+/\text{NADH})})$

$$\Delta G'_0 = -2 \cdot 96500 \cdot (0,42 - (-0,32)) = -142820 \text{ J.mol}^{-1} \text{ soit environ } -143 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

3. Comparaison entre la respiration nitrate et la respiration en aérobiose

Pour pouvoir effectuer une comparaison sous-tendue par un calcul, il convient de chiffrer la variation d'enthalpie libre standard de la respiration en aérobiose.

On a  $\Delta G'_0 = -n \cdot F \cdot \Delta E'_0 = -n \cdot F \cdot (E'_{0(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O})} - E'_{0(\text{NAD}^+/\text{NADH})})$

$$\Delta G'_0 = -2 \cdot 96500 \cdot (0,81 - (-0,32)) = -218090 \text{ J.mol}^{-1} \text{ soit environ } -218 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

La respiration en aérobiose est plus énergétique que la respiration nitrate.

## Exercice 4 Etude de la réaction catalysée par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

1. Etude de la réaction dans les conditions standard biochimiques

1.1. Le couple 1 (3PG / GAP,  $\text{P}_i$ ) ayant un potentiel standard supérieur à celui du couple 2 ( $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ ) est le couple oxydant. La réaction étudiée va dans le sens 2 prévu par l'énoncé, soit :



Les potentiels des 2 couples étant voisins, la réaction est facilement réversible, par exemple, par une simple variation de la concentration des différents réactants.

1.2. On a  $\Delta G'_0 = -n \cdot F \cdot \Delta E'_0$

$$\Delta G'_0 = -2 \cdot 96500 \cdot (-0,29 - (-0,32)) = -5790 \text{ J.mol}^{-1}$$

De plus,  $\Delta G'_0 = -R \cdot T \cdot \ln K'$ . L'application numérique donne :  $-5790 = -8,32 \cdot 303 \cdot \ln K'$ , d'où  $K' = 9,94$

## 2. Etude de la réaction dans des conditions différentes de celles des conditions standard biochimiques

## 2.1. En raisonnant sur les potentiels redox.

Les potentiels redox ( $E'$ ) dans des conditions différentes de celles de l'état standard sont donnés par la relation de Nernst :

$$E' = E'_0 + (0,06/n) \cdot \log ([\text{oxydant}] / [\text{réducteur}])$$

Dans chaque cas, 2 électrons sont échangés, donc  $n = 2$ .

- Pour le couple 1 :  $E' = -0,29 + 0,03 \cdot \log ([3\text{PG}] / ([\text{GAP}] \cdot [\text{P}_i]))$ , donc  $E' = -0,29 + 0,03 \cdot \log (1 / (100 \cdot 1 \cdot 10^{-3})) = -0,26 \text{ V}$

- Pour le couple 2 :  $E' = -0,32 + 0,03 \cdot \log ([\text{NAD}^+] / [\text{NADH}])$ , donc  $E' = -0,32 + 0,03 \cdot \log 200 = -0,25 \text{ V}$ .

Il est à remarquer, pour ce couple, que l'on ne tient pas compte de la concentration en protons. Cela provient du fait que cette concentration est déjà incluse dans la valeur de  $E'_0$ .

Cette fois-ci, le couple 2 a un potentiel supérieur à celui du couple 1 ; il devient le couple oxydant et le sens de la réaction est inversé (sens 1 prévu dans l'énoncé).

## 2.2. En raisonnant sur la variation d'enthalpie libre.

La variation d'enthalpie libre ( $\Delta G'$ ) dans le sens 2 prévu par l'énoncé, mais dans des conditions différentes de celles de l'état standard s'écrit :

$$\Delta G' = \Delta G'_0 + R \cdot T \cdot \ln ([\text{GAP}]_i \cdot [\text{NAD}^+]_i \cdot [\text{P}_i]_i / ([3\text{PG}]_i \cdot [\text{NADH}]_i))$$

Remarques : l'indice \* i \* signifie qu'il s'agit des concentrations initiales. On ne tient pas compte de la concentration en protons, celle-ci étant déjà incluse dans la valeur de  $\Delta G'_0$ .

$$\Delta G' = -5790 + 8,32 \cdot 303 \cdot \ln (100 \cdot 200 \cdot 1 \cdot 10^{-3}) = +1762 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$\Delta G'$  étant positif, le sens envisagé (sens 2 de l'énoncé) n'est pas thermodynamiquement favorisé. La réaction a donc lieu dans l'autre sens (sens 1 de l'énoncé).

## 2.3. En raisonnant sur la constante d'équilibre.

Pour le sens 2 de la réaction :

$$K' = [\text{GAP}]_e \cdot [\text{NAD}^+]_e \cdot [\text{P}_i]_e / ([3\text{PG}]_e \cdot [\text{NADH}]_e)$$

Les concentrations indiquées sont les concentrations à l'équilibre (la concentration en protons, soit  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  est intégrée dans la valeur de  $K'$ ).

Cela dit, si l'on remplace les concentrations à l'équilibre par les concentrations initiales, on peut voir si ces concentrations initiales sont voisines des conditions des concentrations à l'équilibre.

$$K' = 100 \cdot 200 \cdot 1 \cdot 10^{-3} = 20$$

Cette valeur de  $K'$  est supérieure à la valeur obtenue à la question 1. Pour retrouver cette valeur, les concentrations des composés du 2<sup>e</sup> membre de l'équation de la réaction biochimique (figurant au numérateur de la fraction dans l'expression de  $K'$ ) doivent baisser et, par conséquent, les concentrations des composés du 1<sup>er</sup> membre de l'équation de la réaction biochimique (figurant au dénominateur dans l'expression de  $K'$ ) doivent augmenter. C'est ce qui se passe si le sens de la réaction étudiée est inversé.

**Exercice 5** Utilisation cellulaire du glucose

## 1. Phosphorylation directe du glucose

## 1.1. On a la réaction :



Calcul de  $K'_1$  : on a la relation  $\Delta G'_{01} = -R \cdot T \cdot \ln K'_1$ , d'où  $K'_1 = e^{-(\Delta G'_{01} / (R \cdot T))}$ . Dans cette relation,  $R$  est la constante des gaz parfaits et  $T$  la température absolue.

$$K'_1 = e^{-(13800 / (8,32 \cdot 310))} = 4,75 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$$

La valeur de  $K'_1$  montre que la phosphorylation directe du glucose n'est pas envisageable d'un point de vue thermodynamique à l'état standard. Le signe de  $\Delta G'_{01}$  confirme d'ailleurs que cette réaction est endergonique.

1.2. Dans le cas des concentrations érythrocytaires, la variation d'enthalpie libre  $\Delta G'_1$  est reliée à  $\Delta G'_{01}$  par la relation :

$$\Delta G'_1 = \Delta G'_{01} + R \cdot T \cdot \ln ([\text{glucose-6-P}] / ([\text{glucose}] \cdot [\text{P}_i]))$$

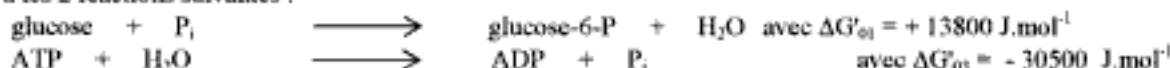
relation où  $[\text{glucose-6-P}]$ ,  $[\text{glucose}]$  et  $[\text{P}_i]$  sont respectivement les concentrations physiologiques en glucose-6-P, glucose et en  $\text{P}_i$ .

$$\Delta G'_1 = +13800 + 8,32 \cdot 310 \cdot \ln(83 \cdot 10^{-6} / (5,0 \cdot 10^{-3} \cdot 1,0 \cdot 10^{-3})) = +21050 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

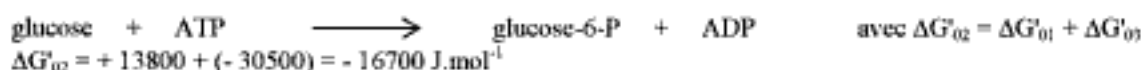
Dans les conditions des concentrations physiologiques, la réaction envisagée est encore plus endergonique ; la phosphorylation directe du glucose n'est toujours pas possible thermodynamiquement.

## 2. Couplage réactionnel avec l'hydrolyse de l'ATP

2.1. On a les 2 réactions suivantes :



Le bilan réactionnel s'écrit :



La réaction précédente, envisagée de gauche à droite, est exergonique. Le couplage réactionnel de la réaction de phosphorylation du glucose est thermodynamiquement favorable dans les conditions standard.

2.2. Comme pour la question 1.2., on a :

$$\Delta G'_2 = \Delta G'_{02} + R \cdot T \cdot \ln([ \text{glucose-6-P} ] \cdot [ \text{ADP} ] / ([ \text{glucose} ] \cdot [ \text{ATP} ]))$$

$$\Delta G'_2 = -16700 + 8,32 \cdot 310 \cdot \ln(83 \cdot 10^{-6} \cdot 138 \cdot 10^{-6} / (5,0 \cdot 10^{-3} \cdot 1850 \cdot 10^{-6})) = -33965 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}, \text{ soit } -34000 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

La réaction est fortement exergonique, donc thermodynamiquement favorisée.

2.3. Les enzymes n'ont pas d'influence sur la variation d'enthalpie libre des réactions à catalyser, mais l'équilibre des réactions est atteint plus rapidement.

2.4. Etant donné les valeurs de  $\Delta G'_{02}$  et de  $\Delta G'_2$ , le passage glucose-6-P  $\rightarrow$  glucose n'est pas envisageable par ce système enzymatique, ni dans les conditions standard, ni dans les conditions physiologiques. Ce passage s'effectue par la réaction vue à la question 1.1, prise dans le sens de droite à gauche, grâce à la glucose-6-phosphatase. La variation d'enthalpie libre est alors de  $-\Delta G'_{01}$  pour les conditions standard, soit  $-13800 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

### Exercice 6 Réaction catalysée par la phosphofructokinase (PFK)

Soit la réaction :



La variation d'enthalpie libre standard  $\Delta G'_0$  à 37 °C permet de calculer la constante d'équilibre  $K'$  de la réaction catalysée par la PFK à pH = 7 et à 37 °C.

On a  $\Delta G'_0 = -R \cdot T \cdot \ln K'$  soit  $K' = e^{-\Delta G'_0 / (R \cdot T)}$ , d'où  $K' = e^{14200 / (8,32 \cdot 310)} = 246$  (nombre sans dimension).

Si les conditions de concentration des réactants à l'état stationnaire dans l'érythrocyte sont compatibles avec la constante d'équilibre précédemment calculée, on doit retrouver numériquement la valeur précédente de 246 en remplaçant dans l'expression de  $K'$  la concentration des réactants par leur concentration à l'équilibre.

On a :

$$\text{soit } K' = ([ \text{ADP} ] \cdot [ \text{FBP} ]) / ([ \text{ATP} ] \cdot [ \text{FP} ])$$

$$K' = 138 \cdot 10^{-6} \cdot 31 \cdot 10^{-6} / (1850 \cdot 10^{-6} \cdot 14 \cdot 10^{-6}) = 0,165$$

Cette valeur est très nettement différente de celle calculée à partir de la variation d'enthalpie libre ( $K' = 246$ ). Les conditions de concentration dans l'érythrocyte à l'état stationnaire ne sont pas compatibles avec la valeur de  $K'$ .

La valeur  $K' = 246$  est obtenue en isolant artificiellement la réaction catalysée par la PFK de son contexte cellulaire, alors que les concentrations physiologiques des différents réactants sont la résultante de l'ensemble des réactions de la voie métabolique.

### Exercice 7 Réaction catalysée par la pyruvate kinase (PK)

Soit la réaction catalysée par la PK :



Dans des conditions différentes de celles de l'état standard, on a  $\Delta G' = \Delta G'_0 + R \cdot T \cdot \ln([ \text{pyruvate} ] \cdot [ \text{ATP} ] / ([ \text{PEP} ] \cdot [ \text{ADP} ]))$ . Pour que la réaction catalysée par la PK change de sens, il faut que  $\Delta G'$  soit  $> 0$ . En effet, la relation précédente s'applique pour la réaction prise dans le sens de gauche à droite ; donc pour que le sens de la réaction soit inversé, il faut que le sens gauche  $\rightarrow$  droite de la réaction soit thermodynamiquement défavorisé ( $\Delta G' > 0$ ).

On a donc  $-31400 + 8,32 \cdot 310 \cdot \ln([\text{pyruvate}]_2 / [\text{pyruvate}]_1) > 0$ . La résolution de cette inéquation donne  $[\text{pyruvate}]_2 > 0,33 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Cette concentration élevée n'est pas envisageable d'un point de vue physiologique. Le passage pyruvate  $\rightarrow$  PEP s'effectue d'ailleurs dans la cellule par la pyruvate carboxylase en présence d'ATP.

### Exercice 8 Force protomotrice

#### 1. Modification de l'équation "a" de l'énoncé

1.1. On envisage ici le passage d'une mole proton de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie.

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln([X_2] / [X_1]) + z \cdot F \cdot (\psi_2 - \psi_1) = 2,3 \cdot R \cdot T \cdot (\log[H^+]_{\text{in}} - \log[H^+]_{\text{ex}}) + z \cdot F \cdot (\psi_{\text{in}} - \psi_{\text{ex}})$$

$$\Delta G = 2,3 \cdot R \cdot T \cdot (\text{pH}_{\text{ex}} - \text{pH}_{\text{in}}) + z \cdot F \cdot (\psi_{\text{in}} - \psi_{\text{ex}})$$

Finalement, on a

$$\Delta G = 2,3 \cdot R \cdot T \cdot \Delta \text{pH} + z \cdot F \cdot \Delta \psi$$

Dans les expressions précédentes, les indices "in" et "ex" font respectivement référence à l'intérieur et à l'extérieur de la mitochondrie (voir énoncé).

1.3. La variation d'enthalpie libre accompagnant le transfert de 2 moles de protons de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie est :

$$\Delta G = 2 \cdot (-2,3 \cdot 8,32 \cdot 310 \cdot 1 + (-1 \cdot 96500 \cdot 0,150)) = -40814 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}, \text{ soit environ } -40,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Il est à remarquer que dans le sens envisagé ici,  $\Delta \text{pH}$  et  $\Delta \psi$  sont négatifs. C'est donc également le cas de  $\Delta G$  ; le sens envisagé pour le transfert d'une mole de proton est donc thermodynamiquement favorable, le proton allant dans le sens du gradient de concentration. Ceci est à l'origine de la force protomotrice.

La valeur obtenue est suffisante pour expliquer la synthèse d'une mole d'ATP à partir d'ADP si l'on considère  $\Delta G'_0$  de cette synthèse ( $+30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), mais pas si l'on considère  $\Delta G'$  ( $+50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Dans ce dernier cas, il faudrait envisager le transfert de 3 moles de protons pour la synthèse d'une mole d'ATP.

#### 2. Force protomotrice chez *E. coli*

##### 2.1. Calcul de la force protomotrice

Ce calcul est le même que celui effectué à la question 1.2. Avec les nouvelles valeurs numériques, on obtient  $\Delta G = -18,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

2.2. Variation d'enthalpie libre nécessaire pour permettre le passage d'une mole de lactose contre le gradient de concentration de lactose observé

On a :

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln([\text{lactose}]_2 / [\text{lactose}]_1) + z \cdot F \cdot (\psi_2 - \psi_1).$$

Le lactose n'étant pas chargé,  $z = 0$  (intérieur noté 1, extérieur noté 2).

Donc  $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln([\text{lactose}]_2 / [\text{lactose}]_1)$ .

$$\Delta G = 8,32 \cdot 310 \cdot \ln 100 = +11,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}.$$

Le transfert d'une mole de proton est suffisant pour permettre le passage d'une mole de lactose contre le gradient de concentration.

## 7. Initiation à la modélisation des réacteurs biologiques

### 1. Généralités

- Les réacteurs biologiques sont des installations mettant en œuvre des transformations de la matière par des catalyseurs biologiques (enzymes, microorganismes) ;
- Les réacteurs enzymatiques sont les plus simples à mettre en œuvre industriellement, mais les réacteurs à microorganismes sont les plus nombreux, on parle dans ce cas de fermenteurs ;
- Les réacteurs biologiques peuvent être homogènes (à enzymes solubles, à cellules dispersées, ...) ou hétérogènes (à enzymes immobilisées, à cellules fixées, fermenteurs aérés, ...).

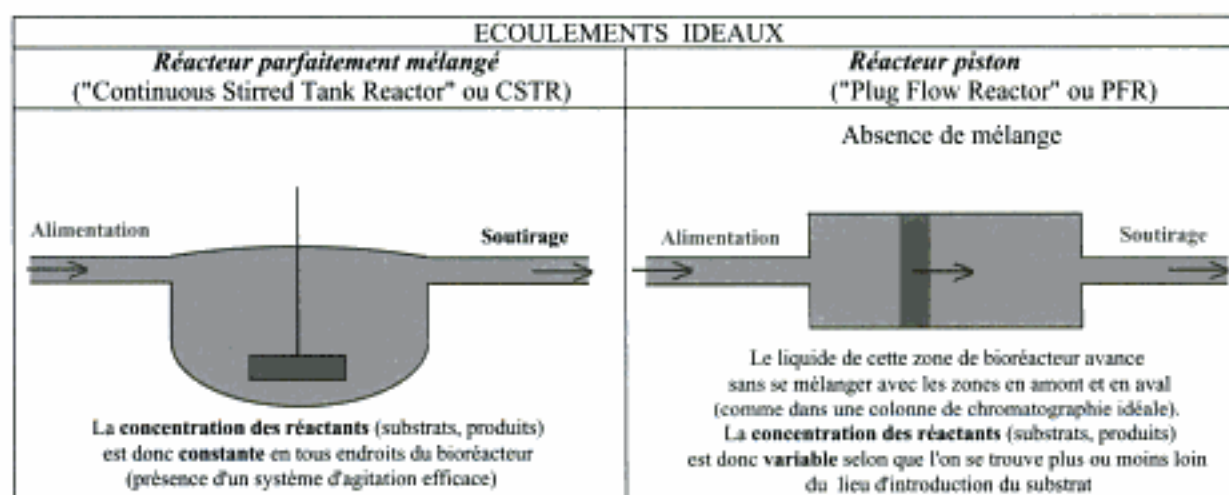
Les différents **modes de mise en œuvre** des réacteurs biologiques figurent dans le tableau ci-dessous :

| Mode de mise en œuvre |            | Discontinu (batch)                         | Continu ou ouvert            | Semi-continu (fed-batch)               |
|-----------------------|------------|--------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|
| Introduction          | réactifs   | simultanée au début du procédé             | en permanence                | permanente ou intermittente            |
|                       | catalyseur |                                            | éventuellement en permanence | au début du procédé                    |
| Soutirage             | produits   | simultané après un temps de réaction donné | en permanence                | absence de soutirage durant le procédé |
|                       | catalyseur |                                            | en permanence (parfois)      |                                        |

Les **critères de performance** sont nombreux :

- taux de conversion du substrat (exprimé, par exemple, en pourcentage de substrat transformé) ;
- concentration finale en produit ;
- productivité (exprimée, par exemple, en g de substrat transformé par heure et par litre de réacteur) ;
- efficacité d'utilisation des biocatalyseurs (exprimée, par exemple, en g de substrat transformé par g de catalyseur utilisé) ;
- efficacité énergétique (exprimée, par exemple, en g de substrat transformé par kWh utilisé).

### 2. Ecoulements dans les réacteurs continus



Lors de la mise en œuvre de bioréacteurs en grand volume, les écoulements ne sont plus idéaux, c'est à dire que les deux types d'écoulement coexistent, même si l'un d'eux prédomine.

Pour simplifier les calculs (en particulier ceux qui suivent), on se place dans un des deux cas d'écoulement idéal.

### 3. Réacteurs enzymatiques

#### 3.1. Technique des bilans

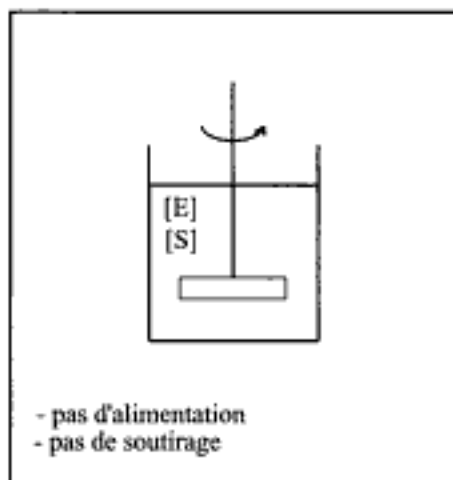
Tout réacteur peut être modélisé à partir de la technique dite "des bilans" (en substrat, en produit, en biomasse, ...). Cette modélisation, appliquée à l'ensemble du réacteur, se présente sous la forme de l'équation suivante :

$$\text{vitesse d'entrée} + \text{vitesse de production} = \text{vitesse de sortie} + \text{vitesse de variation interne}$$

#### 3.2. Réacteurs enzymatiques discontinus (batch)

Pour ce qui concerne la modélisation des réacteurs biologiques, on est amené à utiliser différentes expressions de la vitesse, comme :

- $v$  : vitesse de réaction exprimée, par exemple, en  $\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$  ou  $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  ;
- $v''$  : vitesse de réaction par unité de surface exprimée, par exemple en  $\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  ou  $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  ;
- $v'''$  : vitesse de réaction par unité de volume ou vitesse volumique exprimée, par exemple, en  $\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$  ou  $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ .



Prenons maintenant l'exemple d'un substrat S transformé en un produit P sous l'action d'une enzyme E.

Le suivi de la réaction s'effectue classiquement par détermination de l'évolution de la concentration en substrat [S] ou en produit [P] en fonction du temps.

La technique des bilans (vue au paragraphe 3.1.) appliquée à la quantité de substrat à un temps t sur l'ensemble du réacteur donne :

$$0 - v_S = 0 + d(n_S) / dt$$

avec  $v_S$  : vitesse de production du substrat (affectée d'un signe " - " du fait que la quantité de substrat diminue dans le réacteur)  
 $n_S$  : nombre de moles de substrat dans le réacteur.

En introduisant la vitesse de production du substrat par unité de volume  $v'''_S$ , l'équation devient (V étant le volume total du réacteur) :

$$0 - v'''_S \cdot V = 0 + d([S] \cdot V) / dt \\ = 0 + V \cdot d[S] / dt \text{ puisque V est constant.}$$

Au final, on aura :

$$v'''_S = - d[S] / dt \quad (\text{équation 1})$$

On retrouve l'expression de la vitesse initiale (exprimée par unité de volume) classique en enzymologie :

$$v_i = - d[S] / dt$$

Cette expression de la vitesse initiale est donc valable pour modéliser un réacteur discontinu, type de réacteur d'ailleurs couramment mis en œuvre en travaux pratiques.

**L'objectif fixé par une modélisation d'un réacteur est de pouvoir calculer l'évolution de la concentration en substrat [S] (ou en produit [P]) dans le réacteur en fonction du temps t.**

Dans la plupart des cas, les enzymes utilisées dans l'industrie suivent la loi de Michaelis et Menten.

On a, dans ce cas :

$$v_i''' = - d[S] / dt = V_{\max}''' \cdot [S] / (K_M + [S]).$$

- Dans le cas où  $[S] < K_M$ ,  $v_i''' = - d[S] / dt = V_{\max}''' \cdot [S] / K_M = k \cdot [S]$  avec  $k = V_{\max}''' / K_M$  (cinétique d'ordre I par rapport au substrat).

On a  $- d[S] / [S] = k \cdot dt$  et donc  $\int_{[S_0]}^S d[S] / [S] = \int_0^t -k \cdot dt$ . La résolution de l'équation différentielle donne  $\ln[S] = -k \cdot t + \text{constante}$ . La valeur de la constante est obtenue à partir des conditions initiales ; pour  $t = 0$ ,  $[S] = [S_0]$ , donc la constante est égale à  $\ln[S_0]$ . Au final, on a  $\ln([S] / [S_0]) = -k \cdot t$  ou encore :

$$[S] = [S_0] \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{équation 2})$$



- Dans le cas où  $[S]$  n'est pas négligeable devant  $K_M$ , le modèle cinétique de Michaelis ne peut se simplifier. L'intégration de l'équation différentielle :  $v_i'' = -d[S]/dt = V_{max}'' \cdot [S] / (K_M + [S])$  entre le temps 0 où la concentration en substrat est  $[S_0]$  et le temps  $t$  où la concentration en substrat est  $[S]$  donne :

$$V_{max}'' \cdot t = K_M \cdot \ln([S_0] / [S]) + ([S_0] - [S]) \quad (\text{équation 3})$$

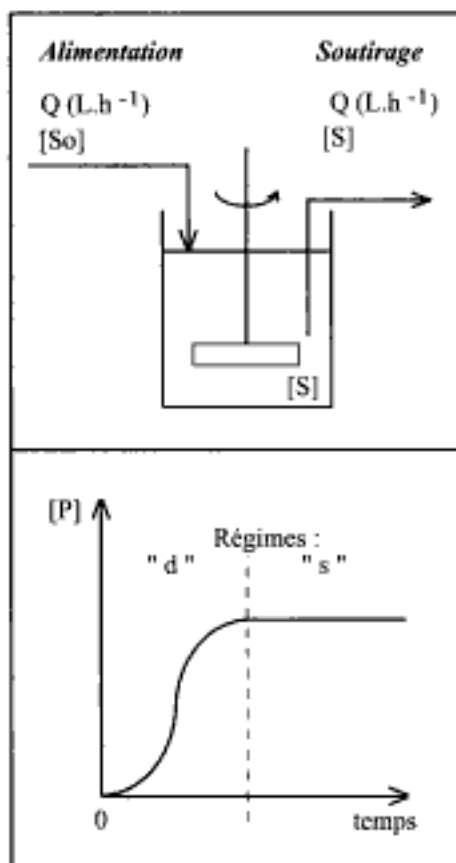
- Il convient naturellement d'apporter des correctifs à l'équation de Michaelis au cas où il y aurait, par exemple, des inhibitions par excès de substrat ou par le produit. Les modèles cinétiques correspondants sont connus et le traitement mathématique reste possible tout en étant évidemment plus complexe.

Il est donc possible de calculer toute concentration en substrat à un temps  $t$  et de comparer le résultat obtenu à la réalité expérimentale, manière de vérifier la validité de la modélisation effectuée. Cet aspect est illustré dans l'exercice 1.

### 3.3. Réacteurs enzymatiques continus

La modélisation de ces réacteurs nécessite toujours la connaissance de la cinétique enzymatique, mais cela n'est plus suffisant, il faut la compléter par l'étude de l'écoulement des fluides. Ici, on se limitera aux cas des écoulements idéaux limites vus au paragraphe 2.

#### 3.3.1. Réacteur parfaitement mélangé



Un tel réacteur ne peut pas être modélisé par l'expression "habituelle" de la vitesse  $v''_S = -d[S]/dt$  rencontrée pour les réacteurs discontinus. La concentration en substrat à l'intérieur du réacteur est constante en fonction du temps.

Supposons un débit en substrat " $Q$ " exprimé en L.h<sup>-1</sup>, la concentration en substrat ajouté est égale à  $[S_0]$ , celle à l'intérieur du réacteur est uniforme et égale à  $[S]$ ; le bilan en quantité de substrat sur le réacteur de volume  $V$  donne :

$$Q \cdot [S_0] - v''_S \cdot V = Q \cdot [S] + V \cdot d[S]/dt$$

Le réacteur, après un régime dynamique "d", atteint un régime stationnaire "s", caractérisé par  $d[S]/dt = 0$  (voir schéma ci-contre).

Dans le cas intéressant du régime stationnaire, le bilan précédemment établi s'écrit :

$$Q \cdot ([S_0] - [S]) = v''_S \cdot V \quad (\text{équation 4})$$

En admettant une réaction enzymatique d'ordre 1 par rapport au substrat :  $v''_S = k \cdot [S]$ , le bilan devient :

$$Q \cdot ([S_0] - [S]) = k \cdot [S] \cdot V, \text{ soit en développant}$$

$$Q \cdot [S_0] - Q \cdot [S] = k \cdot [S] \cdot V,$$

ou encore  $[S] = Q \cdot [S_0] / (Q + k \cdot V)$ .

En introduisant la notion de temps de passage  $\tau = V / Q$ , on a finalement :

$$[S] = [S_0] / (1 + k \cdot \tau) \quad (\text{équation 5})$$

L'expérience indique que, pour atteindre l'état stationnaire, il faut compter un temps équivalent à environ  $5 \cdot \tau$ .

#### 3.3.2. Réacteur piston



Dans ce type d'écoulement, il n'y a pas de mélange, les gradients de concentration subsistent au niveau du réacteur. Le bilan en quantité de substrat sur tout le réacteur est impossible à réaliser, il faut effectuer ce bilan sur un élément de volume  $dV$ . Le calcul, plus complexe, n'est pas développé ici.

Dans le cas d'une cinétique d'ordre 1 par rapport au substrat, le traitement mathématique donne :

$$[S] = [S_0] \cdot e^{-k \cdot \tau} \quad (\text{équation 6}).$$

Cette expression ressemble à l'équation (2) du réacteur discontinu dans le cas d'une cinétique d'ordre 1 avec  $t$  remplacé par  $\tau$  (temps de passage =  $V / Q$ ).

Pour terminer, il est intéressant de savoir qui, du réacteur parfaitement mélangé ou du réacteur piston, est le plus efficace dans le cas d'une cinétique d'ordre 1. En prenant arbitrairement  $k \cdot \tau = 1$ , pour le réacteur parfaitement mélangé, on a  $[S] = [S_0] / 2$  et, pour le réacteur piston,  $[S] = [S_0] / 2,7$ . Ce dernier, présentant un taux de conversion plus important est donc plus performant.

L'exercice 2 aborde la question des réacteurs enzymatiques continus.

## 4. Les fermenteurs

### 4.1. Fermenteurs discontinus (batch)

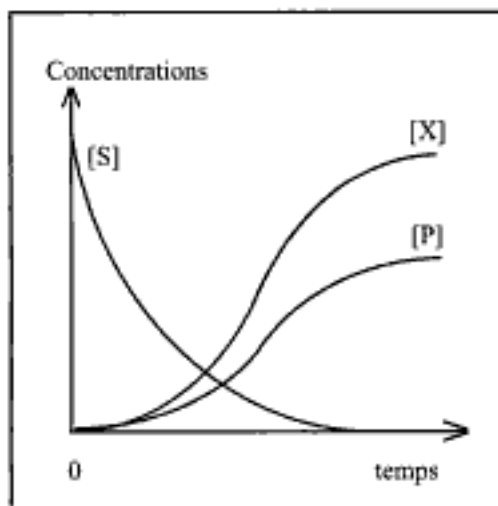
Le milieu de culture de volume  $V$  est inoculé avec une concentration  $[X_0]$  en biomasse. L'évolution dans le temps des concentrations en biomasse notée  $[X]$ , substrat notée  $[S]$  et produit notée  $[P]$ , est décrite par les équations différentielles suivantes :

$$v_X'' = d[X] / dt \text{ soit } v_X = V \cdot d[X] / dt ; \quad v_S'' = - d[S] / dt \text{ soit } v_S = - V \cdot d[S] / dt \text{ et } v_P'' = d[P] / dt \text{ soit } v_P = V \cdot d[P] / dt.$$

Ces vitesses sont les lois de croissance, d'utilisation du substrat et de formation du produit. Le substrat  $S$  peut représenter la source de carbone, d'azote, d'oxygène ou de n'importe quel élément nécessaire au microorganisme.

Ces vitesses (exprimées par unité de volume) deviennent dans le cas simple décrit ci-dessous :

- la croissance n'est limitée par aucun substrat :  $v_X'' = \mu_{\max} \cdot [X]$  où  $\mu_{\max}$  est la vitesse spécifique maximale de croissance ;
- l'utilisation du substrat est proportionnelle à la croissance :  $v_S'' = v_X'' / Y_{X/S}$  où  $Y_{X/S}$  est le rendement du substrat en biomasse ;  $Y_{X/S} = ([X] - [X_0]) / ([S_0] - [S])$  ;
- la production de métabolite est associée à la croissance :  $v_P'' = v_X'' \cdot Y_{P/X}$  où  $Y_{P/X}$  est le rendement de la biomasse en produit ;  $Y_{P/X} = ([P] - [P_0]) / ([X] - [X_0])$ .



L'évolution des concentrations en  $X$ ,  $S$  et  $P$  est donnée par :

- $[X] = [X_0] \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$  après intégration de l'équation différentielle correspondante ;
- $[S] = [S_0] - ([X] - [X_0]) / Y_{X/S} = [S_0] - [X_0] \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1) / Y_{X/S}$  ;
- $[P] = Y_{P/X} \cdot ([X] - [X_0]) = Y_{P/X} \cdot [X_0] \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1)$ .

Dans ces expressions,  $[X_0]$  et  $[S_0]$  sont les concentrations initiales en biomasse et en substrat.

La croissance exponentielle continue jusqu'à ce que l'un des substrats devienne limitant. Les équations précédentes doivent alors être modifiées en introduisant dans les calculs une loi tenant compte du substrat limitant ; cette loi est souvent celle de Monod :

$$v_X'' = \mu_{\max} \cdot [S] \cdot [X] / (K_S + [S])$$

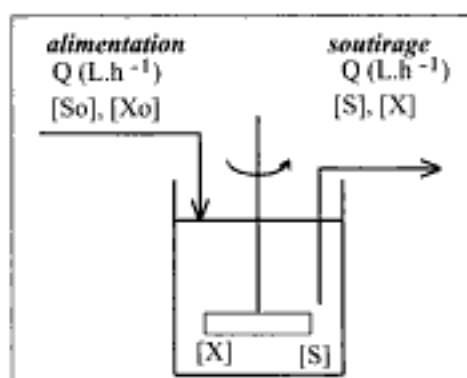
où  $K_S$  est la constante " de Monod ".

L'évolution des concentrations peut être plus complexe dans de nombreux cas (rendements non constants, périodes de latence importantes, utilisation séquentielle de substrats, inhibition par les produits formés, ...). Des applications du fermenteur discontinu sont proposées dans les exercices 3 et 4.

## 4.2. Fermenteur semi-continu (fed-batch)

Ce type de fermenteur est assez difficile à modéliser. Une modélisation partielle est proposée, à titre d'exemple, au niveau de l'exercice 5.

## 4.3. Fermenteur continu (parfaitement mélangé, chémostat)



Dans un fermenteur de ce type, l'apport de nouveau substrat permet de prolonger la croissance des microorganismes. Il est également possible de maintenir un état stationnaire, tel que la concentration en biomasse  $[X]$ , la composition chimique du milieu, ainsi que la vitesse de croissance restent constantes. Ce type de culture est très utile, par exemple, pour produire en continu de la biomasse ou un métabolite dans des conditions optimales. Le schéma ci-contre illustre ce type de fermenteur.

La modélisation du chémostat a également pour point de départ la technique des bilans :

vitesse d'entrée + vitesse de production = vitesse de sortie + vitesse de variation interne.

- Le bilan en biomasse donne :  $Q \cdot [X_0] + v_x^m \cdot V = Q \cdot [X] + d([X] \cdot V) / dt$ .

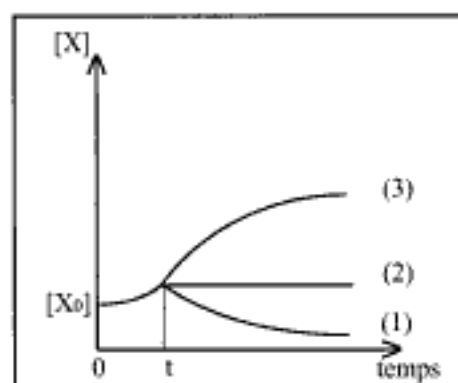
Après une période transitoire, on parvient à un état stationnaire ( $d([X] \cdot V) / dt = 0$ ) pour lequel,

$$v_x^m = Q \cdot ([X] - [X_0]) / V.$$

Si l'on introduit la vitesse de dilution  $D = Q / V$  (inverse du temps de passage - voir paragraphe 3.3.1.) et l'équation de la vitesse  $v_x^m = \mu \cdot [X]$  (le substrat étant limitant,  $\mu$  remplace  $\mu_{max}$  dans l'expression de la vitesse de croissance), on a  $\mu \cdot [X] = D \cdot ([X] - [X_0])$ . Si l'alimentation ne comporte pas de microorganismes, le fermenteur étant initialement ensemencé, le bilan se réduit à la simple égalité :

$$\mu = D$$

Cela montre qu'en imposant un taux de dilution donné, on peut imposer facilement une vitesse spécifique de croissance à une culture microbologique. Il en serait de même pour une culture de cellules eucaryotes en cytot culture.



On démarre le chémostat en effectuant une première croissance en batch pendant un temps  $t^*$ . Lorsque l'alimentation du chémostat est mise en route, trois cas d'évolution sont possibles :

- (1) la vitesse de soutirage de biomasse est supérieure à la vitesse de croissance ;
- (2) la vitesse de soutirage de biomasse est égale à la vitesse de croissance ;**
- (3) la vitesse de soutirage de biomasse est inférieure à la vitesse de croissance.

- Le bilan substrat donne :

$Q \cdot [S_0] - v_s^m \cdot V = Q \cdot [S] + d([S] \cdot V) / dt$ . En introduisant le rendement du substrat en biomasse  $Y_{X/S} = v_x^m / v_s^m$ , la vitesse de dilution  $D = Q / V$ , le bilan à l'état stationnaire ( $d([S] \cdot V) / dt = 0$ ) donne :

$D \cdot [S_0] - \mu \cdot [X] / Y_{X/S} = D \cdot [S]$ , et, en tenant compte du bilan en biomasse précédemment établi,  $\mu = D$ , on obtient la relation suivante :

$$[X] = Y_{X/S} \cdot ([S_0] - [S]) \quad (\text{équation 7})$$

Application pratique : dans les cas simples où un seul substrat est limitant, il est facile de choisir la concentration en biomasse désirée à partir de la concentration du substrat limitant.

- Le bilan produit s'écrit :

$0 + v_p^m \cdot V = Q \cdot [P] + d([P] \cdot V) / dt$ . Si la formation de produit est associée à la croissance avec

un rendement produit-biomasse  $Y_{P/X}$ , le bilan à l'état stationnaire ( $d([P] \cdot V) / dt = 0$ ) donne :

$$Y_{P/X} \cdot \mu \cdot [X] = D \cdot [P] \text{ ou encore } Y_{P/X} \cdot [X] = [P].$$

En conclusion, les relations importantes en fermentation continue sont :

$$\mu = D \quad \text{et} \quad [X] = Y_{X/S} \cdot ([S_0] - [S])$$

Pour préciser les choses, il convient d'introduire dans les calculs une loi de croissance pour le microorganisme en fonction du substrat limitant. Dans le cas d'une loi de Monod, cela donne :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot [S] / (K_S + [S])$$

En extrayant [S] de cette dernière équation et en écrivant que  $\mu = D$ , on obtient finalement :

$$[S] = K_S / ((\mu_{\max} / D) - 1) \quad (\text{équation 8})$$

$$\text{et} \quad [X] = Y_{X/S} \cdot ([S_0] - K_S / ((\mu_{\max} / D) - 1)) \quad (\text{équation 9})$$

Le fermenteur ne peut se maintenir à l'état stationnaire que si la vitesse de dilution est inférieure à une valeur critique  $D^*$ . Pour  $D > D^*$ , les cellules sont emportées plus rapidement qu'elles ne peuvent croître, il y a lessivage ("wash out").  $D^*$  est donné par la relation :

$$D^* = \mu_{\max} \cdot [S_0] / (K_S + [S_0])$$

et dans le cas où  $[S_0] > K_S$ ,

$$D^* = \mu_{\max}$$

Le chémostat est illustré par des exemples au niveau des exercices 6 et 7.

## Énoncés des exercices

L'ensemble des exercices de ce chapitre est de niveau post-baccalauréat

### Exercice 1 Réacteur enzymatique discontinu (batch)

La glucoamylase hydrolyse le maltose en glucose selon l'équation :



Les paramètres cinétiques de la glucoamylase, déterminés à 40 °C, sont  $V_{\max} = 10 \mu\text{mol de maltose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg d'enzyme})^{-1}$  et  $K_M = 35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

D'autre part, le glucose, produit de la réaction, se comporte comme un inhibiteur compétitif du maltose ( $K_I = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

1. L'hydrolyse enzymatique à 40 °C du maltose est mise en œuvre dans un réacteur discontinu de 1000 L. La concentration initiale du maltose  $[S_0]$  est de  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  et la concentration en enzyme  $[E]$  est de  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . En faisant abstraction de l'inhibition exercée par le glucose, quel est le temps nécessaire pour que le maltose soit hydrolysé à 99 % ?

2. En comparant les valeurs de  $K_M$  et de  $K_I$ , on se rend compte que la glucoamylase a plus d'affinité pour le glucose (produit et inhibiteur) que pour le maltose (substrat). L'action inhibitrice du glucose doit donc probablement être importante.

Quel est le temps nécessaire pour que le maltose soit hydrolysé à 99 % en prenant en compte l'action inhibitrice exercée par le glucose ? Conclure.

Remarques : - l'établissement des modèles cinétiques des questions 1 et 2 nécessite des connaissances mathématiques au niveau du calcul différentiel ;  
- la question 1 peut être résolue simplement en sélectionnant le bon modèle cinétique dans le cours résumé. Le lecteur se contentera alors de prendre connaissance de la résolution de la question 2, afin de pouvoir conclure.

### Exercice 2 Réacteur enzymatique continu

On souhaite réaliser un réacteur enzymatique continu, impliquant la glucoamylase, enzyme dont les caractéristiques figurent dans l'exercice 1.

On veut traiter en continu une solution de maltose à  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  avec un débit de  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  en ayant 95 % de conversion du maltose.

Si l'on ajoute au débit d'alimentation une solution à  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glucoamylase, calculer les volumes de réacteur à mettre en œuvre pour obtenir la conversion souhaitée.

1. Dans le cas d'un réacteur parfaitement mélangé en ne tenant pas compte, puis en tenant compte de l'inhibition compétitive exercée par le glucose (dans ce cas, il suffit de remplacer  $K_M$  par  $K_{Mapp}$  dans la modélisation).

2. Dans le cas d'un réacteur piston en ne tenant pas compte de l'inhibition exercée par le glucose.

3. Compléter le tableau ci-dessous et conclure.

| Réacteur                                                | Mélange | Piston |
|---------------------------------------------------------|---------|--------|
| Volume sans tenir compte de l'inhibition du glucose (L) |         |        |
| Volume en tenant compte de l'inhibition du glucose (L)  |         | 720    |

Donnée : dans le cas du réacteur piston, la modélisation en faisant abstraction de l'inhibition exercée par le glucose conduit à l'expression suivante :

$$V \cdot V_{\max} = K_M \cdot Q \cdot \ln([S_0] / [S]) + Q \cdot ([S_0] - [S])$$

Dans cette expression,  $V$  est le volume du réacteur,  $V_{\max}$  la vitesse maximale de l'enzyme par unité de volume,  $K_M$  la constante de Michaelis,  $Q$  le débit utilisé,  $[S_0]$  la concentration en substrat ajouté et  $[S]$  la concentration en substrat restant après hydrolyse.

**Exercice 3** Fermenteur discontinu (batch)

L'étude cinétique en culture batch aéré de la production de levures de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* donne les résultats suivants :

| Temps en h                        | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 12   | 14   | 16   | 18   |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Biomasse [X] en g.L <sup>-1</sup> | 0,20 | 0,21 | 0,25 | 0,33 | 0,42 | 0,55 | 0,70 | 0,82 | 0,90 | 0,92 | 0,95 | 1,15 | 1,35 | 1,60 | 1,65 |
| Glucose [S] en g.L <sup>-1</sup>  | 5,00 | 4,80 | 4,60 | 4,00 | 3,40 | 2,60 | 1,50 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ethanol [E] en g.L <sup>-1</sup>  | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,20 | 0,35 | 0,50 | 0,75 | 0,90 | 1,05 | 1,00 | 0,95 | 0,70 | 0,40 | 0,10 | 0,00 |

N.B : le dioxygène n'est jamais limitant au cours de cette étude, les propriétés rhéologiques du système d'aération assurant un transfert suffisant du dioxygène.

1. Tracer sur un même graphique les courbes  $[X] = f(\text{temps})$ ,  $[S] = f(\text{temps})$  et  $[E] = f(\text{temps})$ . Ces courbes mettent en évidence deux phases successives : commenter ce phénomène.
2. Calculer les vitesses spécifiques de croissance sur glucose et sur éthanol.
3. Calculer les rendements du glucose en biomasse ( $Y_{XS}$ ) et glucose en éthanol ( $Y_{ES}$ ) durant la première phase.
4. Calculer le rendement de l'éthanol en biomasse ( $Y_{XE}$ ) durant la deuxième phase.

**Exercice 4** Calcul de la durée de mise en œuvre d'un réacteur

On met en culture liquide *Saccharomyces cerevisiae* dans un fermenteur discontinu (batch). La source de carbone est le glucose, présent initialement à une concentration "[X<sub>0</sub>]" = 5 g.L<sup>-1</sup>.

Calculer la durée "d" du batch en supposant la culture constamment en phase exponentielle de croissance.

Données :

- temps de doublement "t<sub>D</sub>" (temps de génération) de *Saccharomyces cerevisiae* : 1,83 h ;
- rendement du substrat en biomasse "Y<sub>X/S</sub>" = 0,26 g de biomasse par g de glucose ;
- concentration initiale en biomasse [X<sub>0</sub>] = 0,20 g.L<sup>-1</sup>.

**Exercice 5** Production de levures en semi-continu

La production de levures de boulangerie dans un fermenteur aéré s'accompagne d'une formation d'éthanol en présence d'un excès de source de carbone (effet Crabtree).

Pour minimiser cette production d'éthanol et obtenir une production maximale de biomasse, il est nécessaire de ne pas dépasser un seuil critique de la concentration en glucose au cours de la croissance de la levure. Une technique adaptée à cette exigence est la culture en semi-continu ou fed-batch.

Pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la concentration optimale de glucose [S], à 30°C, est de 30 mg.L<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  est de 0,2 h<sup>-1</sup> et le rendement de synthèse de biomasse Y<sub>X/S</sub> de 0,5 g de levure par g de glucose.

On met en œuvre la production de *Saccharomyces cerevisiae* dans une cuve de fermentation alimentée en continu par un milieu contenant 200 g.L<sup>-1</sup> de glucose [S<sub>A</sub>]. Le milieu de culture n'est pas soutiré du fermenteur. Celui-ci contient initialement 25 L (V<sub>0</sub>) d'inoculum à 1 g.L<sup>-1</sup> [X<sub>0</sub>] de levure et à 30 mg.L<sup>-1</sup> [S<sub>0</sub>] de glucose. La concentration en glucose est maintenue constante pendant l'ensemble du procédé, donc [S] = [S<sub>0</sub>].

1. Quelle est la fonction "débit Q" à programmer pour maintenir la concentration en glucose à 30 mg.L<sup>-1</sup> au cours du temps ?

Le substrat n'étant jamais limitant (puisqu'il est ajouté en permanence), la production de levures s'arrête par manque de dioxygène (valeur critique : 1 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>).

2. Calculer la vitesse maximale de transfert de dioxygène v<sub>O<sub>2</sub></sub> par unité de volume.

Donnée :  $v_{O_2} = k_L a ([O_2^*] - [O_2 \text{ critique}])$

avec k<sub>L</sub>a (paramètre qui quantifie les propriétés rhéologiques du fermenteur) = 700 h<sup>-1</sup> et [O<sub>2</sub>\*] (concentration initiale en dioxygène dans le fermenteur) = 14 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.

3. Calculer la vitesse maximale de production de biomasse v<sub>X</sub> par unité de volume. En déduire la concentration maximale en biomasse [X<sub>max</sub>].

Donnée :  $v_X = v_{O_2} / Y_{O_2X}$

4. La fermentation s'arrêtant au bout de 24 h, quel est alors le volume de milieu dans le fermenteur ?

Hidden page

Hidden page



$$Q \cdot ([S_0] - [S]) = V \cdot (V_{\max}^m \cdot [S]) / (K_M + [S]), \text{ d'où } V = Q \cdot ([S_0] - [S]) \cdot (K_M + [S]) / (V_{\max}^m \cdot [S])$$

Il convient, bien entendu, d'exprimer les grandeurs dans des unités compatibles entre elles :

$Q = 1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $[S_0] = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[S] = 0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_M = 35 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $V_{\max}^m$  par unité de volume =  $2 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (la concentration en enzyme utilisée est de  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Dans ce cas, on obtient le volume  $V$  en litres.

$$V = 1 \cdot (1 - 0,05) \cdot (35 \cdot 10^{-3} + 0,05) / (2 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \cdot 0,05) = 80,75 \text{ L}, \text{ soit environ } 81 \text{ L}.$$

- En tenant compte de l'inhibition exercée par le glucose

Le glucose, exerçant une inhibition de nature compétitive, il suffit de remplacer dans le calcul précédent,  $K_M$  par  $K_{Mapp}$ .

$$K_{Mapp} = K_M \cdot (1 + [P] / K_i) \text{ avec } [P] = 2 \cdot ([S_0] - [S])$$

$$[P] = 2 \cdot (1 - 0,05) = 1,9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ et } K_{Mapp} = 35 \cdot 10^{-3} \cdot (1 + 1,9 / 10 \cdot 10^{-3}) = 6,685 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$V = 1 \cdot (1 - 0,05) \cdot (6,685 + 0,05) / (2 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \cdot 0,05) = 6400 \text{ L}$$

Contrairement à l'exercice précédent, il est possible ici de remplacer  $K_M$  par  $K_{Mapp}$  dans le modèle cinétique, puisque la concentration en inhibiteur (glucose) reste constante pendant la durée du procédé.

## 2. Volume du réacteur piston sans tenir compte de l'inhibition exercée par le glucose

L'équation résultant de la modélisation est donnée dans l'énoncé. La valeur numérique des différents paramètres impliqués est donnée ci-dessus.

L'application numérique donne  $V = 52,74 \text{ L}$ , soit environ  $53 \text{ L}$ .

## 3. Récapitulation et conclusion.

- Tableau des résultats :

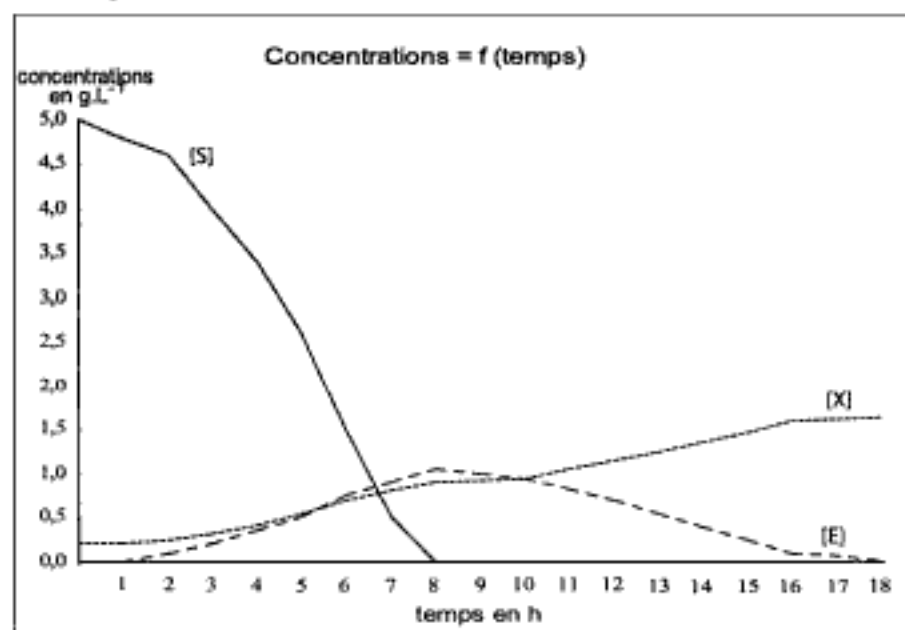
| Réacteur                                                | Mélange | Piston |
|---------------------------------------------------------|---------|--------|
| Volume sans tenir compte de l'inhibition du glucose (L) | 81      | 53     |
| Volume en tenant compte de l'inhibition du glucose (L)  | 6400    | 720    |

- Conclusion :

le réacteur piston se révèle être beaucoup plus efficace que le réacteur parfaitement mélangé en prenant le modèle cinétique valable ( $720 \text{ L}$  au lieu de  $6400 \text{ L}$  !). Ceci s'explique par le fait qu'en début de procédé, il est soumis à une inhibition moins forte de la part du glucose que le réacteur parfaitement mélangé. La meilleure efficacité du réacteur piston par rapport au réacteur parfaitement mélangé n'existe pas toujours, notamment dans le cas d'une inhibition par excès de substrat.

## Exercice 3 Fermenteur discontinu (batch)

### 1. Courbes expérimentales et interprétation :



On note deux phases expérimentales :

- Au cours de la première phase (0 à 8 h), il y a consommation de glucose (premier substrat noté S) par les levures avec production d'éthanol (noté E) et de biomasse (notée X). L'oxygène n'est pas limitant, il y a \*respiration\* du glucose (dégradation du glucose par la glycolyse, suivie de la dégradation du pyruvate formé au niveau du cycle de Krebs) avec

production de biomasse et également fermentation du glucose avec production d'éthanol, du fait de l'excès de glucose (effet Crabtree) ;

- Au cours de la deuxième phase (8 à 18 h), il y a "respiration" de l'éthanol (présence d'oxygène non limitant) avec production de biomasse. Le glucose ayant été complètement utilisé, l'éthanol sert à son tour de substrat (second substrat).

Il s'agit là d'un phénomène assimilable à une diauxie, c'est à dire croissance cellulaire avec utilisation successive de 2 substrats.

## 2. Calcul des vitesses spécifiques de croissance sur glucose et sur éthanol.

L'équation des bilans appliquée à la biomasse X sur l'ensemble du fermenteur de volume V constant donne :

- vitesse d'entrée + vitesse de production = vitesse de sortie + vitesse de variation interne :

$$0 + v^m_X \cdot V = 0 + V \cdot d[X] / dt, \text{ soit } v^m_X = d[X] / dt$$

Or, quand le substrat n'est pas limitant, la vitesse s'écrit  $v^m_X = \mu \cdot [X]$  (voir cours au paragraphe 4.1.), donc  $\mu \cdot [X] = d[X] / dt$  ou  $\mu \cdot dt = d[X] / [X]$ .

La primitive de  $d[X] / [X]$  est  $\ln[X]$ , et, compte tenu du fait que la concentration initiale en biomasse est  $[X_0]$ , l'intégration de l'équation différentielle donne :

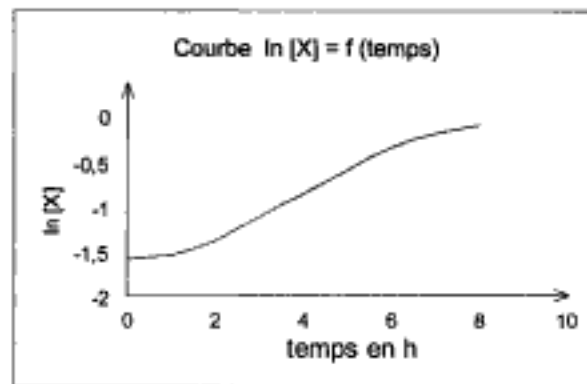
$$[X] = [X_0] \cdot e^{\mu \cdot t} \text{ ou } \ln[X] = \ln[X_0] + \mu \cdot t$$

- En représentant graphiquement  $\ln[X] = f(t)$ , on obtient une partie linéaire tant que le substrat n'est pas limitant, partie linéaire dont la pente donne le  $\mu_{\max}$  sur glucose pour les résultats de la première phase et le  $\mu_{\max}$  sur éthanol pour les résultats de la deuxième phase.

Le tableau des résultats pour la première phase donne (en se limitant à 3 chiffres significatifs pour  $\ln [X]$ ) :

| Temps en h                        | 0     | 1     | 2     | 3     | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Biomasse [X] en g.L <sup>-1</sup> | 0,20  | 0,21  | 0,25  | 0,33  | 0,42   | 0,55   | 0,70   | 0,82   | 0,90   |
| $\ln [X]$                         | -1,61 | -1,56 | -1,39 | -1,11 | -0,868 | -0,598 | -0,357 | -0,198 | -0,105 |

La représentation graphique  $\ln [X] = f(t)$  se trouve ci-dessous. Elle présente une partie linéaire entre 2 et 6 h.



- L'équation de la droite de régression est :  $\ln [X] = -1,90 + 0,258 \cdot t$  (en se limitant toujours à 3 chiffres significatifs) avec  $r = 0,9997$ . La pente de la droite donne  $\mu_{\max}$  sur glucose, soit environ  $0,26 \text{ h}^{-1}$ . Une approche identique pour la deuxième phase donne  $\mu_{\max}$  sur éthanol =  $0,08 \text{ h}^{-1}$ .

Les levures se développent mieux sur glucose que sur éthanol.

## 3. Détermination des rendements durant la première phase

- rendement ( $Y_{X/S}$ ) du glucose en biomasse

$$Y_{X/S} = ([X] - [X_0]) / ([S_0] - [S]) \text{ (voir paragraphe 4.1. du cours)}$$

En représentant graphiquement  $([X] - [X_0]) = f([S_0] - [S])$ , on obtient une droite, dont la pente est  $Y_{X/S}$ .

$$Y_{X/S} = 0,14 \text{ g de biomasse formée par g de glucose utilisé ;}$$

- rendement ( $Y_{E/S}$ ) du glucose en éthanol

$$Y_{E/S} = ([E] - [E_0]) / ([S_0] - [S])$$

En représentant graphiquement  $([E] - [E_0]) = f([S_0] - [S])$ , on obtient une droite, dont la pente est  $Y_{E/S}$ .

$$Y_{E/S} = 0,20 \text{ g d'éthanol formé par g de glucose utilisé}$$

Hidden page

Hidden page

## Exercice 6 Production de biomasse en continu

## 1. Application de la technique des bilans :

- Bilan en biomasse :

$$0 + v_X \cdot V = Q \cdot [X] + 0, \quad \text{ou encore puisque } v_X = \mu \cdot [X], \quad \mu \cdot [X] \cdot V = Q \cdot [X]$$

avec  $v_X$  vitesse de production de biomasse par unité de volume,  $V$  volume du réacteur,  $[X]$  concentration en biomasse,  $Q$  débit du substrat et  $\mu$  vitesse spécifique de croissance.

Dans ce cas,  $[S] < K_S$ , donc la loi de Monod s'écrit :  $\mu = \mu_{\max} \cdot [S] / K_S$

$$\mu_{\max} \cdot [S] \cdot V = Q \cdot K_S$$

Finalement, on obtient :

$$[S] = Q \cdot K_S / V \cdot \mu_{\max}$$

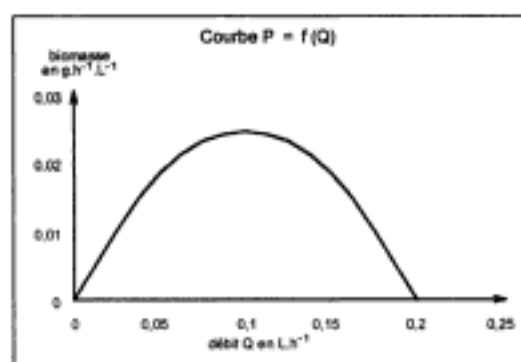
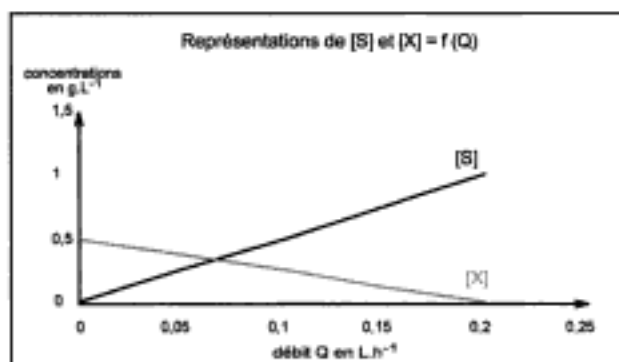
- Bilan en substrat : il a déjà été établi dans le cours (équation 7) :

$$[X] = Y_{X/S} \cdot ([S_0] - [S])$$

Le tableau suivant donne quelques exemples de valeurs pour  $[X]$  et  $[S]$  en  $\text{g.L}^{-1}$  :

| Q en $\text{L.h}^{-1}$ | [S] en $\text{g.L}^{-1}$ | [X] en $\text{g.L}^{-1}$ |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0,05                   | 0,25                     | 0,375                    |
| 0,10                   | 0,50                     | 0,250                    |
| 0,15                   | 0,75                     | 0,125                    |
| 0,20                   | 1,00                     | 0,000                    |

La représentation graphique de la variation des concentrations en substrat et en biomasse en fonction du débit d'alimentation en glucose se trouve ci-dessous.



2. La productivité en biomasse est :  $P = Q \cdot [X]$  en  $\text{g.h}^{-1}$ , c'est à dire en reprenant l'expression de l'équation 7 précédente :

$$Q \cdot Y_{X/S} \cdot ([S_0] - [S]). \quad \text{Or } [S] = Q \cdot K_S / V \cdot \mu_{\max} \text{ (voir question 1)}$$

$$[S] = Q \cdot 10 / (10 \cdot 0,2) = 5 \cdot Q \text{ et la productivité } P \text{ de biomasse s'écrit :}$$

$$P = Q \cdot 0,5 \cdot (1 - 5 \cdot Q) = 0,5 \cdot Q - 2,5 \cdot Q^2$$

Il s'agit de l'équation d'une parabole (voir graphique Courbe  $P = f(Q)$  ci-dessus). Cette parabole a un maximum quand la dérivée s'annule. La dérivée a pour expression :  $0,5 - 5 \cdot Q$  ; cette dérivée s'annule pour  $Q = 0,1 \text{ L.h}^{-1}$ .

Le débit le plus favorable pour la production de biomasse est donc de  $0,1 \text{ L.h}^{-1}$ .

**Exercice 7** Production d'*Enterobacter cloacae*

1. Calcul du rendement du glycérol en biomasse  $Y_{X/S}$

$$Y_{X/S} = 1,325 / 2,5 = 0,53 \text{ g de biomasse par g de glycérol}$$

2. Calcul des vitesses de dilution  $D_1$ ,  $D_2$  et  $D_3$

$$D = Q / V, \text{ d'où } D_1 = 5 / 20 = 0,25 \text{ h}^{-1}, D_2 = 0,5 \text{ h}^{-1} \text{ et } D_3 = 1 \text{ h}^{-1}$$

3. Vitesse de dilution critique  $D^*$

La vitesse de dilution critique  $D^*$  est obtenue pour  $D^* = \mu_{\max}$  (voir cours) =  $0,85 \text{ h}^{-1}$ . Seules les vitesses de dilution  $D_1$  et  $D_2$  sont possibles parmi les dilutions proposées pour qu'il y ait croissance cellulaire ; avec la vitesse de dilution  $D_3$ , il y a lessivage.

4. Calcul de la concentration en biomasse  $[X]$  pour les vitesses de dilution choisies à la question 3.

Le bilan en biomasse donne :  $[S] = K_S / ((\mu_{\max} / D) - 1)$  (équation 8 du cours).

Le bilan en substrat donne :  $[X] = Y_{X/S} \cdot ([S_0] - K_S / ((\mu_{\max} / D) - 1))$  (équation 9 du cours).

Pour  $D_1$ ,  $[X] = 1,322 \text{ g.L}^{-1}$  et pour  $D_2$ ,  $[X] = 1,316 \text{ g.L}^{-1}$ .

5. Calcul de la productivité en  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Conclusion.

- Pour  $D_1$ ,  $Q \cdot [X] / V = 5 \cdot 1,322 / 20 = 0,33 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ;

- Pour  $D_2$ ,  $Q \cdot [X] / V = 10 \cdot 1 \cdot 1,316 / 20 = 0,66 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

La vitesse de dilution  $D_2$  donne une productivité supérieure à celle de la vitesse de dilution  $D_1$ . Ce résultat est prévisible, car la productivité est proportionnelle à  $Q$ . La productivité est certes aussi proportionnelle à la concentration en biomasse  $[X]$ , mais  $D$  modifie peu  $[X]$ , comme le montrent les résultats obtenus à la question 4.

Hidden page

## 8 - Biologie moléculaire et génie génétique

### 1. Constituants des nucléosides, nucléotides et acides nucléiques

|                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |                                                            |                                                                   |                                                          |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| P<br>H<br>O<br>S<br>P<br>H<br>A<br>T<br>E | - acide phosphorique $H_3PO_4$ , triacide de $pK_a = 2,1 - 7,2 - 12,4$ ;<br>- à $pH = 7$ , le phosphate a donc une charge globale de $-1,5$ ;<br>- forme des liaisons ester avec les fonctions alcool des oses ;<br>- forme des liaisons anhydride phosphate avec un autre groupement phosphate. |                                                    | <p>Acide phosphorique</p>                                  | ↑<br>N<br>U<br>C<br>L<br>E<br>O<br>T<br>I<br>D<br>E<br>↓          |                                                          |
|                                           | P<br>E<br>N<br>T<br>O<br>S<br>E                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>Ribose (β-D-ribofuranose) pour l'ARN</p>        | <p>Désoxyribose (β-D-2'-désoxyribofuranose) pour l'ADN</p> |                                                                   |                                                          |
| B<br>A<br>S<br>E                          | Noyau purique                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                    | Noyau pyrimidique                                          |                                                                   |                                                          |
|                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |                                                            |                                                                   |                                                          |
| A<br>Z<br>O<br>T<br>E                     | <p><b>Adénine (A)</b><br/>6-amino-purine</p>                                                                                                                                                                                                                                                     | <p><b>Guanine (G)</b><br/>2-amino-6-oxy-purine</p> | <p><b>Cytosine (C)</b><br/>2-oxy-4-amino-pyrimidine</p>    | <p><b>Thymine (T)</b><br/>2,4-dioxy-5-méthyl-pyrimidine (ADN)</p> | <p><b>Uracile (U)</b><br/>2,4-dioxy-pyrimidine (ARN)</p> |

### 2. Nucléosides, nucléotides

#### 2.1. Structure

Nucléoside : base azotée + pentose. Liaison β-N-glycosidique entre le C<sub>1'</sub> du pentose et N<sub>9</sub> ou N<sub>1</sub> de la base

Nucléotide : Nucléoside + groupement(s) phosphate. Liaison phosphoester entre le phosphate et le C<sub>5'</sub> du pentose

|                                                        |                                                                                          |                                                                                        |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Liaison N-glycosidique</p>                          | <p>Liaison 5'-phosphoester</p>                                                           | <p>Liaisons anhydride phosphate</p> <p>γ β α</p>                                       |
| Désoxycytidine<br>(1-β-D-désoxyribofuranosyl cytosine) | Désoxycytidine-5'-monophosphate<br>(1-β-D-désoxyribofuranosyl-cytosine-5'-monophosphate) | Désoxycytidine-5'-triphosphate<br>(1-β-D-désoxyribofuranosyl-cytosine-5'-triphosphate) |

#### 2.2. Rôles

- constituants des acides nucléiques et de nombreux coenzymes ;
- participent aux phénomènes de transfert d'énergie dans la cellule.



### 2.3. Dérivés

Il existe des dérivés méthylés des bases puriques et pyrimidiques retrouvés principalement dans les ARN de transfert (ARNt) :

- N<sup>6</sup>-méthyladénine (m<sup>6</sup>A) et N<sup>7</sup>-méthylguanine (m<sup>7</sup>G) ;
- 5-méthylecytosine (m<sup>5</sup>C) et 4-thiouracile (s<sup>4</sup>U).

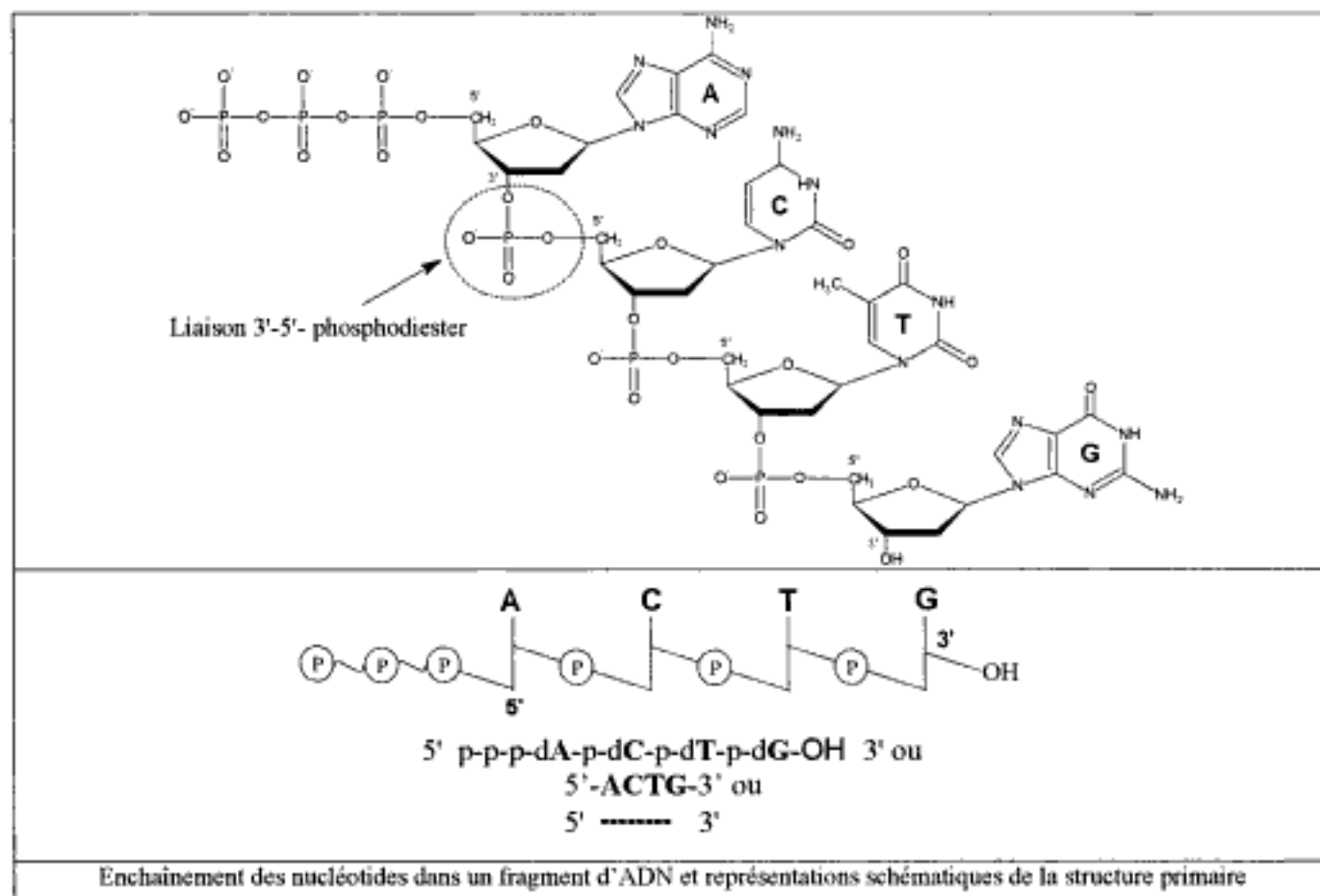
### 2.4. Nomenclature

| Bases    | Nucléosides                  | Ribonucléotides (ARN)<br>Désoxyribonucléotides (ADN)           | Nucléosides monophosphate | Nucléosides triphosphate* |
|----------|------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Adénine  | Adénosine<br>Désoxyadénosine | Adénosine-5'-monophosphate<br>Désoxyadénosine-5'-monophosphate | AMP<br>dAMP               | ATP<br>dATP               |
| Guanine  | Guanosine<br>Désoxyguanosine | Guanosine-5'-monophosphate<br>Désoxyguanosine-5'-monophosphate | GMP<br>dGMP               | GTP<br>dGTP               |
| Cytosine | Cytidine<br>Désoxycytidine   | Cytidine-5'-monophosphate<br>Désoxycytidine-5'-monophosphate   | CMP<br>dCMP               | CTP<br>dCTP               |
| Thymine  | Désoxythymidine              | Désoxythymidine-5'-monophosphate                               | dTMP                      | dTTP                      |
| Uracile  | Uridine                      | Uridine-5'-monophosphate                                       | UMP                       | UTP                       |

\* La synthèse d'un (désoxy)polynucléotide nécessite la présence de (désoxy)nucléosides triphosphate ((d)ATP, (d)GTP, ...).

## 3. Polynucléotides

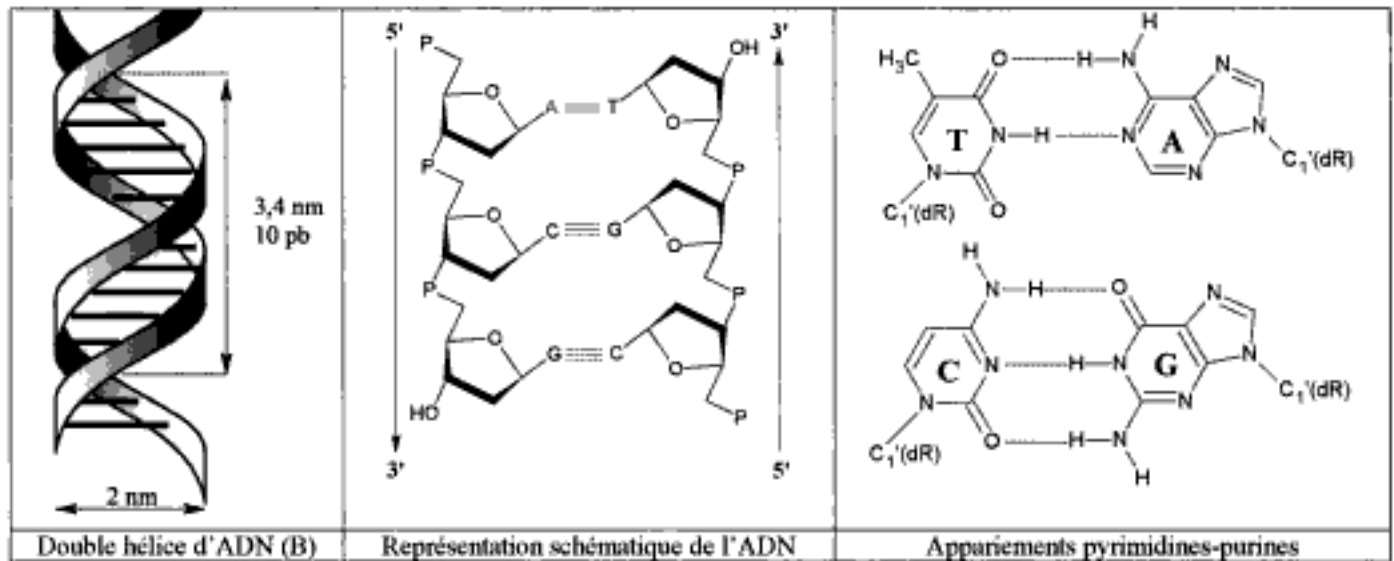
- polymères de (désoxy)ribonucléotides liés par des liaisons phosphodiester ((d)AMP,(d)TMP, (d)CMP,(d)GMP) ;
- la liaison phosphodiester s'établit entre le 3'OH d'un nucléotide et le 5'P du nucléotide suivant ;
- l'enchaînement oses-phosphates représente le squelette de la chaîne ; la séquence de bases forme la partie variable ;
- par convention on lit toujours une chaîne d'acide nucléique dans le sens 5'P (à gauche) vers 3'OH (à droite)
- taille indiquée en nombre de nucléotides (nt).



## 4. ADN

### 4.1. Modèle de la double hélice (Watson & Crick, 1953)

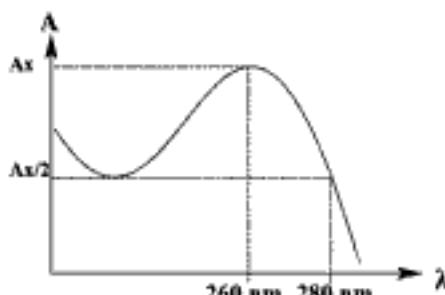
- 2 chaînes nucléotidiques sont enroulées en double hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes ; entre bases complémentaires (A=T et C=G) ;
- 2 brins sont anti-parallèles, l'un orienté 5' - 3' l'autre 3' - 5' ;
- les bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice et empilées à une distance de 0,34 nm ;
- le pas de l'hélice est de 3,4 nm (10 pb par tour d'hélice).



### 4.2. Formes et localisation

| Procaryotes                                                                                                                                                                              | Eucaryotes                                                                                                                                                                                                                                                      | Virus                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN double brin (db)</li> <li>- circulaire en général</li> <li>- cytoplasmique sous forme d'un chromosome ou sous forme de plasmides</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN double brin</li> <li>- essentiellement dans le noyau sous forme linéaire, lié à des protéines formant la chromatine</li> <li>- faible fraction dans les mitochondries et les chloroplastes (circulaire)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN simple brin (sb) ou double brin</li> <li>- circulaire ou linéaire</li> <li>- encapsidé</li> </ul> |

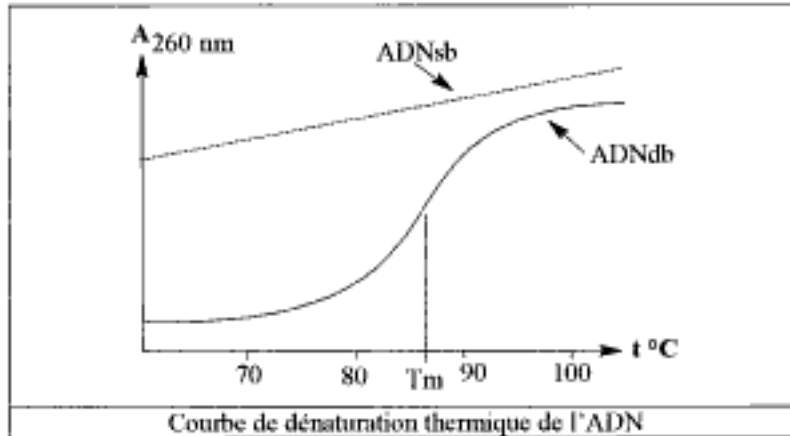
### 4.3. Propriétés physico-chimiques

| Solubilité                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Absorption dans l'UV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Hydrolyse                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- polyanion soluble dans l'eau (solutions visqueuses)</li> <li>- précipite en présence d'éthanol (fibres longues)</li> <li>- insoluble dans le phénol (agent déprotéinisant puissant (anciennement) utilisé pour la purification de l'ADN)</li> </ul> |  <p> <math>A_{260}</math><br/> <math>A_{280}</math> </p> <p>260 nm 280 nm <math>\lambda</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- maximum d'absorption à 260 nm</li> <li>- 1 unité d'absorbance à 260 nm <math>\rightarrow</math> 50 <math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math> d'ADN (db)</li> <li>- <math>\frac{A_{260}}{A_{280}} = 1,8-2</math> pour une solution pure (exempte de protéines)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- hydrolyse acide à chaud entraîne la coupure des liaisons N-glycosidiques</li> </ul> |

- rapport de Chargaff : égalité des concentrations de A et de T, d'un côté, de G et de C, de l'autre, d'où  $A/T = G/C = 1$ ,  $(A+G)/(T+C) = 1$  ;
- le % (G + C) est caractéristique de l'espèce.

#### 4.4. Dénaturation thermique de l'ADN

Le chauffage d'une solution d'ADN provoque sa dénaturation (passage de la forme double brin à la forme simple brin) et s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance à 260 nm (effet hyperchrome) due à la rupture des forces d'empilement des bases et l'entrée en contact avec le solvant. Ceci conduit à une baisse de la viscosité de la solution. L'augmentation de l'absorbance suit une courbe sigmoïde traduisant un effet coopératif : chaque zone dénaturée facilite l'ouverture des autres zones.



ADN sb : ADN simple brin

ADN db : ADN double brin

Remarque : à titre de comparaison, a été indiqué le comportement de l'ADN sb.

Au point d'inflexion de la courbe, on définit la température de fusion ( $T_m$  : "melting temperature"). Elle correspond à la valeur de température pour laquelle 50 % de l'ADN est sous forme simple brin et 50 % sous la forme double brin. Sa valeur augmente avec la longueur du polynucléotide, le % G + C et la force ionique.

#### 4.5. Renaturation de l'ADN

Le refroidissement lent d'une solution d'ADN préalablement dénaturé permet la renaturation de l'ADN.

Il s'accompagne d'un effet hypochrome caractérisé également par un effet coopératif.

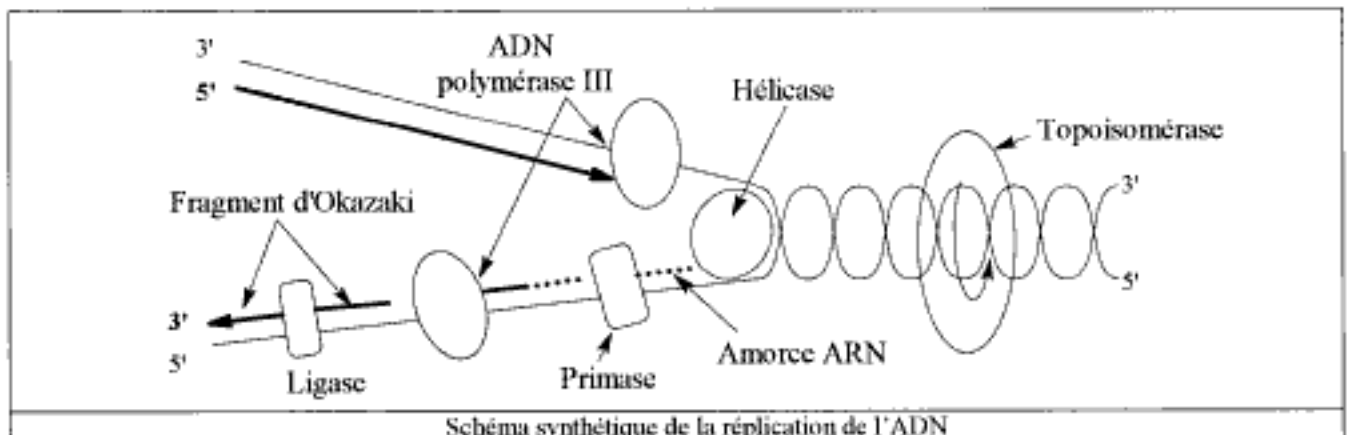
Si le refroidissement est brutal, l'ADN reste sous forme simple brin (ADN trempé).

La vitesse de réassociation dépend de :

- la température : la vitesse augmente avec la température à condition de ne pas dépasser la valeur de  $T_m$  ;
- la force ionique : la vitesse augmente avec la force ionique ;
- la taille de l'ADN : plus la taille de l'ADN est grande, plus la viscosité sera élevée et plus la vitesse de réassociation sera faible.

#### 4.6. Synthèse de l'ADN : la réplication

- synthèse selon un mode semi-conservatif : chaque molécule fille contient un brin néosynthétisé et un brin de la molécule mère ;
- synthèse continue sur le brin 3'-5' et discontinue pour 5'-3' grâce à l'ADN polymérase III ;
- acteurs de la réplication chez les procaryotes :
  - \* ADN matrice, désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ions  $Mg^{2+}$  ;
  - \* topoisomérase : élimine les contraintes de surcroisement créées par l'hélicase ;
  - \* hélicase : déroule le DNA double brin ;
  - \* SSB ("single strand binding protein") : protéine qui stabilise l'ADN monocaténaire ;
  - \* ADN polymérase III : polymérise les désoxyribonucléotides dans sens 5' vers 3' ;
  - \* primase : synthétise les amorces d'ARN nécessaires à la polymérase ;
  - \* ADN ligase : attache les fragments d'Okazaki sur le brin retardé.



## 5. ARN

### 5.1. Caractéristiques et classification

- polymère de ribonucléotides (AMP, UMP, CTP, GTP) ;
- en général monobrin mais peut former des structures en épingle à cheveux ;
- constitue le génome de certains virus (influenza virus, HIV) et peut être simple ou double brin.

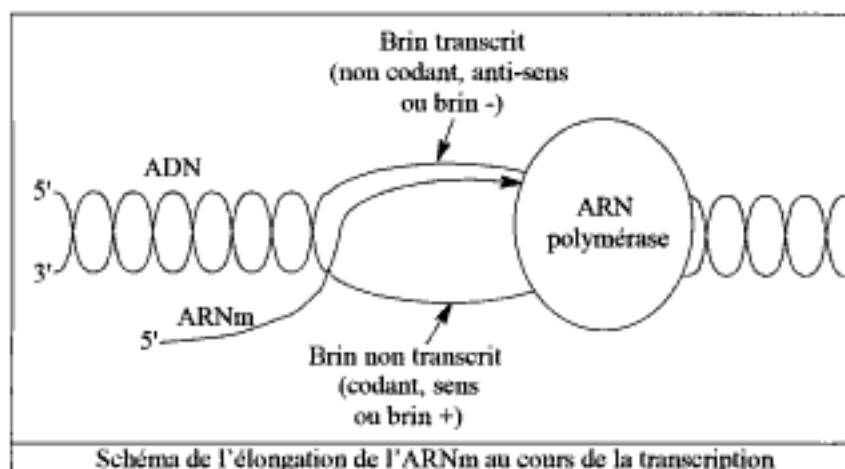
| ARN messager (ARNm)                                                                     | ARN de transfert (ARNt)                                                                                              | ARN ribosomal (ARNr)                                                                                    | ARN "small nuclear" (ARNsn)                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| - produit de la transcription de l'ADN<br>- sert de matrice à la synthèse des protéines | - se charge d'un acide aminé<br>- se fixe sur l'anticodon de l'ARNm<br>- permet l'élongation d'une chaîne peptidique | - 80 % des ARN cellulaires<br>- constituants des ribosomes<br>- participent à la synthèse des protéines | - constituants des spliceosomes chez les eucaryotes<br>- participent à l'épissage |

### 5.2. Propriétés physico-chimiques :

- hydrolyse totale en milieu alcalin par rupture des liaisons phosphodiester ;
- absorption UV : 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ARN.

### 5.3. Synthèse des ARN : la transcription

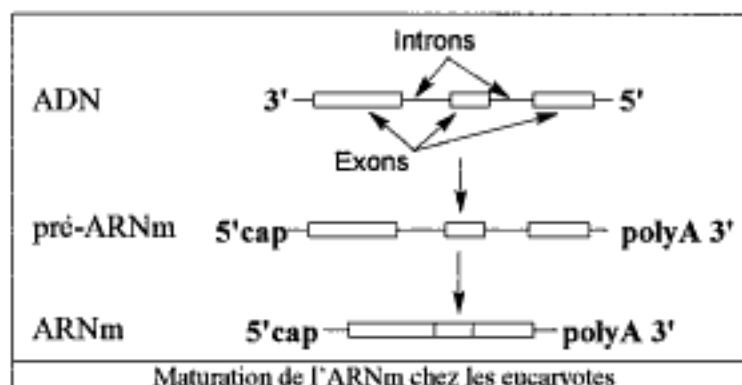
- synthèse d'une molécule complémentaire d'ARN (ARNm, ARNr, ARNt, ...) à partir d'un segment d'ADN matrice ;
- synthèse dans le sens  $5' \rightarrow 3'$  par l'ARN polymérase sur un brin matrice d'ADN  $3' \rightarrow 5'$  ;
- l'ARNm des procaryotes peut être polycistronique ; codant pour plusieurs chaînes polypeptidiques distinctes ;
- acteurs chez les procaryotes: ADN matrice, ARN, nucléotides (ATP, CTP, GTP, UTP) et facteurs de transcription (facteur d'initiation :  $\sigma$  (sigma), facteur de terminaison :  $\rho$  (rho)).



### 5.4. Maturation de l'ARNm chez les eucaryotes

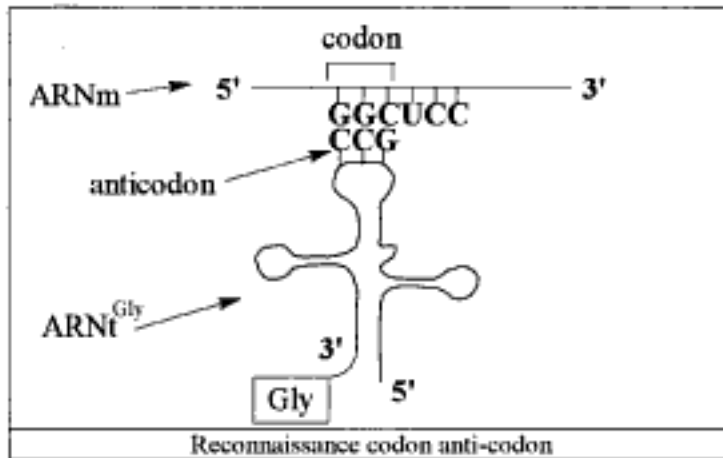
Chez les eucaryotes l'ARNm subit plusieurs transformations avant de quitter le noyau :

- blocage de l'extrémité 5' par une coiffe (cap) par addition d'un GTP (position inversée) ;
- excision et épissage des introns (séquences non codantes) ;
- addition d'une queue polyA (200 résidus environ) à l'extrémité 3'OH.

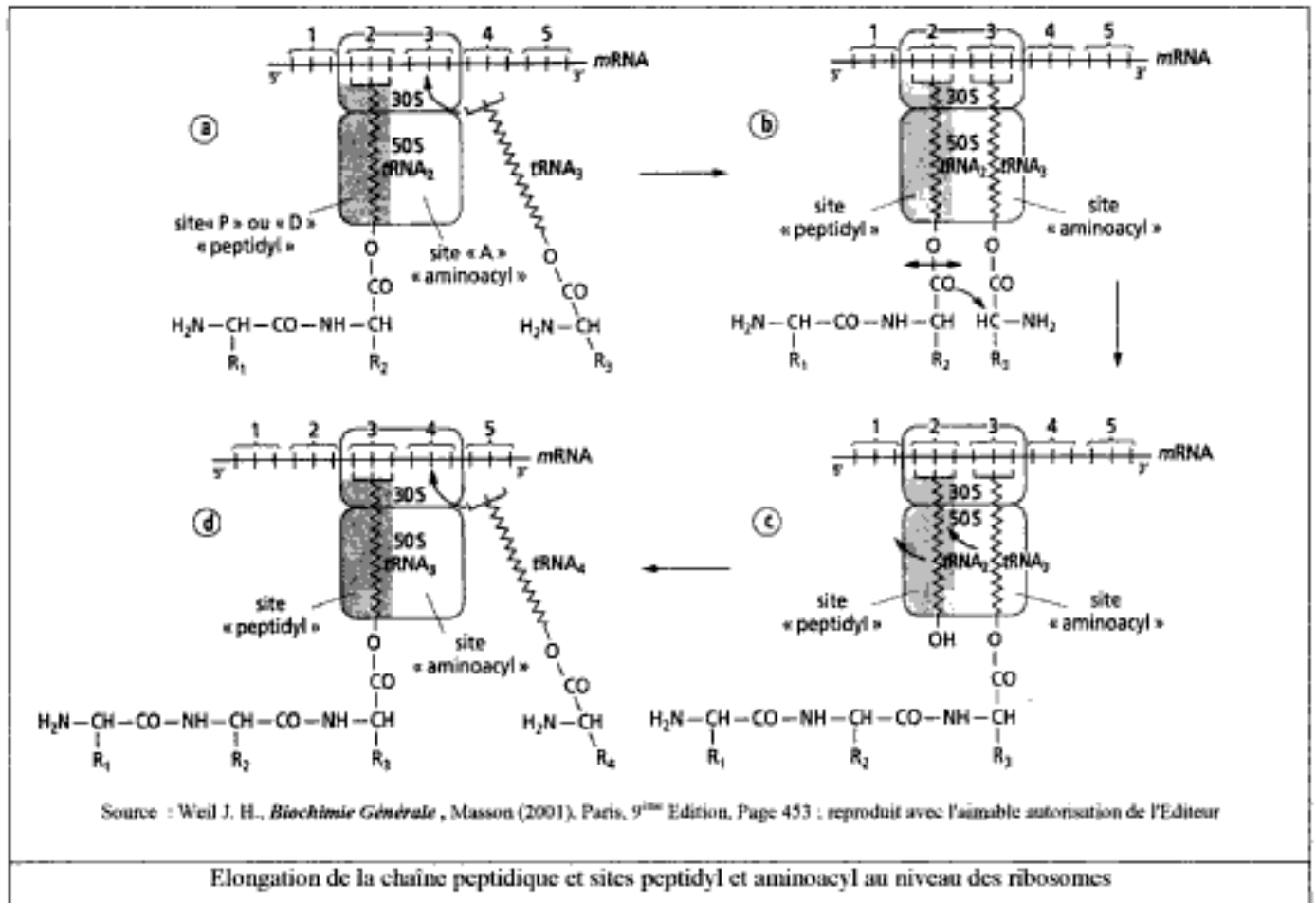


**5.5. Devenir de l'ARNm : la traduction**

Synthèse d'une chaîne polypeptidique à partir d'un segment d'ARNm. Il s'agit d'un décodage de l'information portée par l'ARNm en protéines grâce aux ARNt qui jouent le rôle d'adaptateurs.

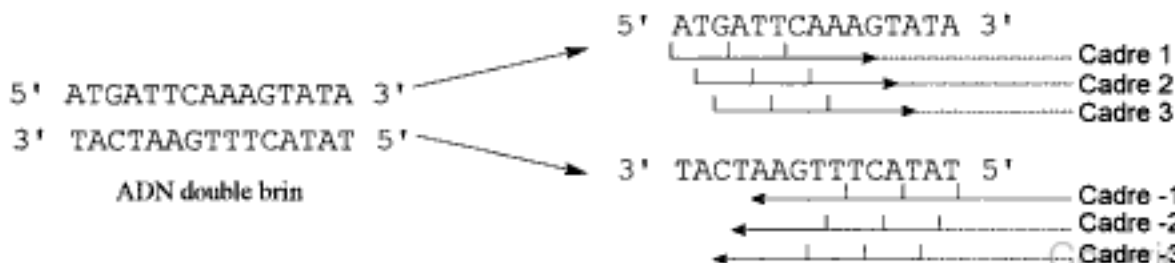


Acteurs de la traduction chez les procaryotes : ARNm, ARN de transfert, ribosomes, facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison, GTP.



**Notion de cadre ouvert de lecture**

Un cadre ouvert de lecture (ORF, "Open reading Frame") est une séquence, non interrompue par des codons stop, codant potentiellement une protéine.



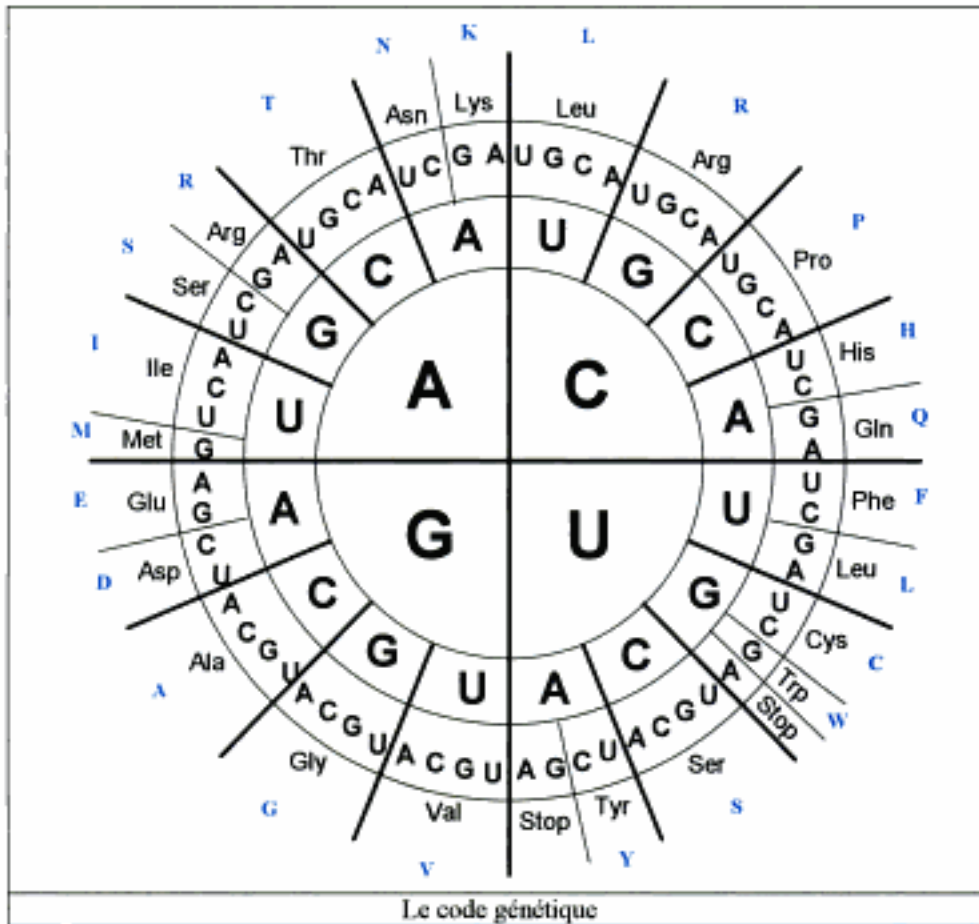
### 5.6. Code génétique

Le code génétique établit la **correspondance entre un codon** (présent sur l'ARNm) et un **acide aminé** : à chaque codon correspond un seul acide aminé mais un acide aminé peut être désigné par plusieurs codons (dégénérescence du code sur la troisième base). L'ARNt est porteur d'un anti codon de séquence complémentaire du codon présent sur l'ARNm.

Trois codons sont dits "stop" ou "non sens" (UAA, UAG et UGA) : ils arrêtent la traduction.

Le code est universel à quelques exceptions près (ADN mitochondrial de l'homme, de la levure, des trypanosomes).

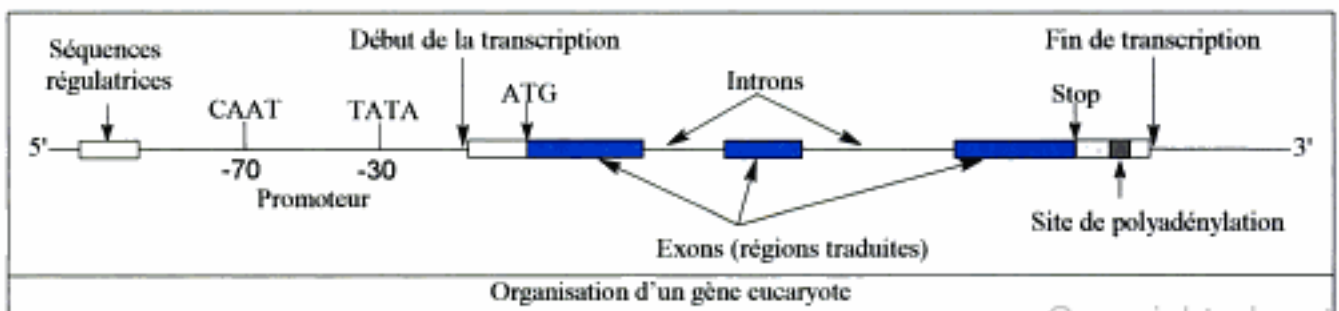
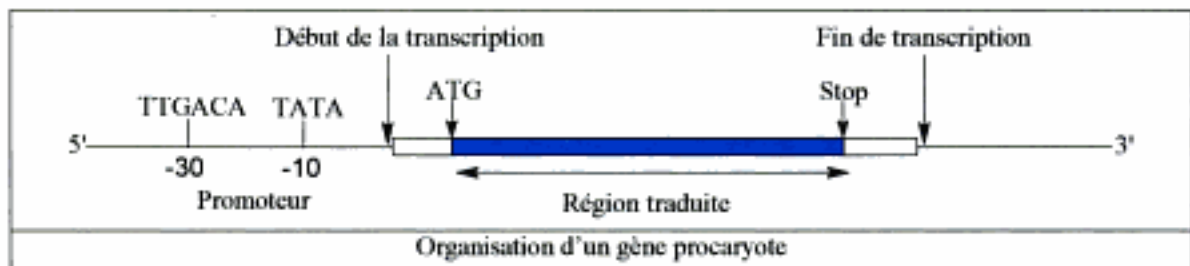
Un ARNt peut reconnaître plusieurs codons (effet Wobble). La complémentarité codon-anticodon est rigoureuse pour les deux premières bases et non pour la troisième.



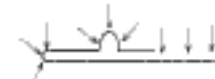
### 6. Organisation des gènes eucaryotes et procaryotes

Un gène désigne l'unité fonctionnelle de l'information génétique. Formé d'un segment d'ADN et destiné à être :

- transcrit en ARN (ARNt, ARNr, ARNsn) ;
- transcrit en ARNm et traduit en protéines.



## 7. Enzymes utilisées en génie génétique

|                                                          | Substrat |       |     | Réactions                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------|----------|-------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                          | ADNdb    | ADNsb | ARN |                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Exonucléases</b>                                      |          |       |     |                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Exonucléase III                                          | +        |       |     | Coupe l'extrémité 3' libre et libère des nucléotides avec production d'extrémités cohésives                                                                                                                                                             |
| Phosphodiesterase de venin de serpent                    |          | +     | +   | Hydrolyse à partir de l'extrémité 3' libre                                                                                                                                                                                                              |
| Phosphodiesterase de rate                                |          | +     | +   | Hydrolyse à partir de l'extrémité 5' libre                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Endonucléases</b>                                     |          |       |     |                                                                                                                                                                                                                                                         |
| DNAse pancréatique                                       | +        |       |     | Coupe au hasard avec formation de fragments d'ADNdb                                                                                                                                                                                                     |
| Nucléase S1                                              |          | +     | +   | <br>Hydrolyse ADN et ARN simple brin                                                                                                                                 |
| Ribonucléase A                                           |          |       | +   | Hydrolyse les liaisons phosphodiesteres du côté 3' des nucléotides pyrimidiques C et U                                                                                                                                                                  |
| Ribonucléase H                                           |          |       | +   | Hydrolyse l'ARN dans les hybrides ARN/ADN                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Endonucléases de restriction (exemples)</b>           |          |       |     |                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <i>Hae III</i><br>( <i>Haemophilus aegyptus</i> )        | +        |       |     | $\begin{array}{c} \downarrow \\ -GGCC- \\ -CCGG- \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} -GG \\ -CC \end{array} + \begin{array}{c} CC- \\ GG- \end{array}$<br>Formation d'extrémités franches ("blunt ends" ou "flush ends")                       |
| <i>BamHI</i><br>( <i>Bacillus amyloliquefaciens H</i> )  | +        |       |     | $\begin{array}{c} \downarrow \\ -GGATCC- \\ -CCTAGG- \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} -G \\ -CCTAG \end{array} + \begin{array}{c} GATCC- \\ G- \end{array}$<br>Formation d'extrémités cohésives ("sticky ends" ou "cohesive ends")          |
| <i>BstEII</i><br>( <i>Bacillus amyloliquefaciens H</i> ) | +        |       |     | $\begin{array}{c} \downarrow \\ -GGTNACC- \\ -CCANTGG- \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} -G \\ -CCANTG \end{array} + \begin{array}{c} GTNACC- \\ G- \end{array}$<br>Formation d'extrémités cohésives<br>N : désigne un nucléotide quelconque |
| <b>Polymérase</b>                                        |          |       |     |                                                                                                                                                                                                                                                         |
| ADN pol I                                                | +        |       |     | Activités polymérase 5' → 3', exonucléase 3' → 5' et exonucléase 5' → 3'                                                                                                                                                                                |
| ADN pol thermorésistante                                 | +        |       |     | Activité polymérase 5' → 3' avec un optimum de température voisin de 65 °C                                                                                                                                                                              |
| Fragment de Klenow                                       | +        |       |     | Activités polymérase 5' → 3' et exonucléase 3' → 5'                                                                                                                                                                                                     |
| ARN pol T3                                               | +        |       |     | Synthèse d'ARN à partir d'ADN matrice                                                                                                                                                                                                                   |
| Transcriptase inverse                                    |          |       | +   | Synthèse d'ADN à partir d'ARN matrice                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Ligase, kinase et phosphatase</b>                     |          |       |     |                                                                                                                                                                                                                                                         |
| ADN Ligase T4                                            | +        |       |     | En présence d'ATP, elle forme des liaisons ester entre 5' et 3'OH                                                                                                                                                                                       |
| Kinase T4                                                | +        | +     | +   | En présence d'ATP, elle transfère le phosphate sur une extrémité 5' déphosphorylée.                                                                                                                                                                     |
| Phosphatase alcaline                                     | +        | +     | +   | Elimine le groupement phosphate de l'extrémité 5'                                                                                                                                                                                                       |

## 8. Vecteurs

Outils de clonage utilisés pour véhiculer et amplifier un fragment d'ADN. Ils sont construits à partir de plasmides, de phages ou de fragments de chromosomes. Ils comportent :

- une origine de réplication pour pouvoir se multiplier dans la cellule hôte ;
- plusieurs sites de restriction uniques au niveau desquels sont insérés les fragments d'ADN (insert) ; ces sites sont regroupés, en général, en un site de clonage multiple (SCM), en anglais "Multiple Cloning Site" (MCS) ;
- des éléments de sélection indicateurs de leur présence dans la cellule hôte ;
- des éléments de sélection indicateurs (rapporteurs) de l'insertion réelle du fragment d'ADN étranger à l'endroit désiré.

Il faut distinguer, entre autres :

- les vecteurs de clonage : vecteurs permettant le transport et la multiplication de l'ADN inséré dans une cellule hôte ;
- les vecteurs d'expression : vecteurs permettant le clonage mais aussi la transcription et la traduction de l'ADN cloné ; en plus des éléments précédemment énumérés, ils comportent un promoteur et des séquences régulatrices.

### 8.1. Vecteurs plasmidiques

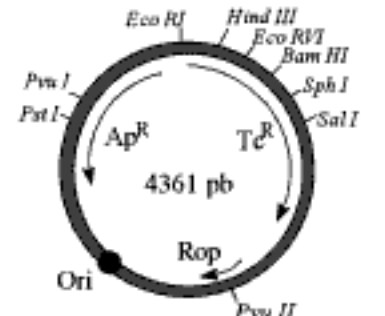
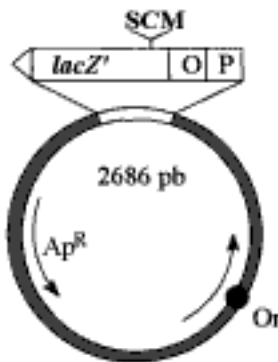
Plasmide : ADN bactérien, circulaire, double brin qui se réplique de manière autonome à partir de sa propre origine de réplication.

Un vecteur plasmidique, comporte :

- une origine de réplication (Ori) ;
- un gène conférant un caractère phénotypique particulier (résistance à un antibiotique) ;
- un ensemble de sites de restriction permettant l'accueil de l'ADN étranger.

Inconvénients des vecteurs plasmidiques :

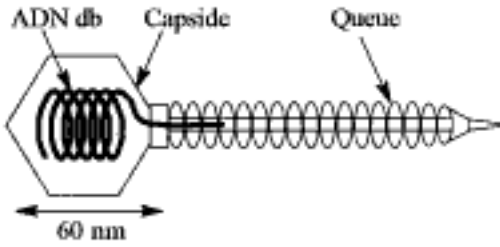
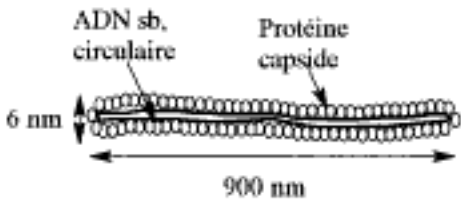
- faible efficacité pour la transformation des bactéries (pénétration de plasmides) ;
- impossibilité d'insérer des larges fragments d'ADN (> 10kb).

| Vecteur pBR322                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Vecteur pUC18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Vecteur de clonage</b>, il comporte :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- deux gènes de résistance à la tétracycline (<math>Tc^R</math>) et à l'ampicilline (<math>Ap^R</math>) avec des sites de restriction uniques ;</li> <li>- une origine de réplication (Ori).</li> </ul> <p>Le gène <i>Rop</i> intervient dans le contrôle du nombre de copies de plasmides par cellule. Une mutation au niveau de ce gène permet d'augmenter le nombre de copies par cellule (&gt; 500).</p> <p>L'insertion d'un ADN étranger au niveau d'un gène de résistance aux antibiotiques abolit la résistance à cet antibiotique et permet la sélection des vecteurs recombinants (sensibilité à cet antibiotique et résistance à l'autre).</p>  | <p><b>Vecteur d'expression</b>, il comporte :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- un gène de résistance à l'ampicilline (<math>Ap^R</math>) ;</li> <li>- le gène <i>lacZ'</i> : fragment du gène <i>lacZ</i> codant pour un peptide <math>\alpha</math> permettant de compléter le gène chromosomique <i>lacZ</i> d'une souche <i>E. coli</i> déficiente en peptide <math>\alpha</math> ;</li> <li>- un site de clonage multiple (SCM) avec plusieurs sites de restriction uniques. Sa présence dans le fragment <i>lacZ'</i> n'affecte pas sa capacité de compléter. Par contre, le clonage d'un fragment d'ADN dans le SCM abolit cette capacité et permet d'identifier les colonies transformées par un test visuel bleu/blanc (voir ci-dessous).</li> </ul>  <p>P : promoteur <i>lacZ</i> permet la fixation de l'ARN polymérase<br/> O : site de fixation du répresseur permettant le contrôle de la transcription par un inducteur non métabolisable tel que l'IPTG (isopropyl-thio-<math>\beta</math>-D-galactoside).</p> <p>Après culture sur milieu contenant de l'ampicilline, les colonies transformées par le plasmide natif synthétisent une <math>\beta</math>-galactosidase fonctionnelle et sont reconnaissables par l'hydrolyse du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-<math>\beta</math>-D-galactoside) incolore en dibromo-5,5'-dichloro-4,4'-indigo de couleur bleue.</p> <p>Les colonies transformées par le plasmide recombinant se présentent sous forme de colonies blanchâtres (absence d'hydrolyse du X-gal).</p> <p>Remarque : des vecteurs d'expression plus performants sont également disponibles (pGEX<sup>TR</sup>, pET<sup>TR</sup>, ...).</p> |



## 8.2. Les vecteurs dérivés des bactériophages

Les bactériophages sont utilisés comme vecteurs grâce à leur capacité de transfert du matériel génétique dans la cellule bactérienne. La taille des fragments à insérer peut atteindre 20 kb environ. L'efficacité de transfert de l'ADN est supérieure à celle des plasmides. Leur utilisation principale est la réalisation de banques d'ADNc.

| Bactériophage $\lambda$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Bactériophage M13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- virus à cycle lytique ou tempéré (cycle lysogénique) qui infecte <i>Escherichia coli</i> ;</li> <li>- ADN linéaire double brin de 485025 pb avec extrémités simples brins complémentaires sur 12 nucléotides (extrémités <i>cos</i> (cohésives)) ;</li> <li>- se fixe au niveau du récepteur du maltose (gène <i>lamB</i>, inductible par le maltose) ; l'ADN pénètre dans la bactérie ;</li> <li>- après pénétration dans la cellule l'ADN se circularise (site <i>cos</i>) et peut se multiplier selon un mode lytique ou lysogène ;</li> <li>- la <i>voie lytique</i> conduit à la lyse de la bactérie et à la libération de 50 à 200 particules virales</li> <li>- la <i>voie lysogénique</i> conduit à l'intégration de l'ADN dans le chromosome bactérien ; après induction, sera déclenché le cycle lytique.</li> </ul>  <p>La construction de vecteurs dérivés du phage <math>\lambda</math> se fait, en général, par :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- élimination des gènes de la lysogénie (25% de l'ADN) ;</li> <li>- introduction de sites uniques de clonage (SMC) ;</li> <li>- introduction de gène rapporteur tel que <i>lacZ'</i> permettant de sélectionner les recombinants par un test coloré.</li> </ul> <p>Exemples de vecteurs dérivés du phage <math>\lambda</math> : <math>\lambda</math>gt10, <math>\lambda</math>gt11, EMBL3, EMBL4, ...</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- virus filamenteux tempéré (production de particules virales sans lyse bactérienne) ;</li> <li>- ADN (+) circulaire simple brin de 6407 nucléotides ;</li> <li>- après pénétration dans la cellule, par l'intermédiaire du pilus sexuel F, l'ADN transformé immédiatement en double brin se circularise (forme répliquative), se duplique et sert de matrice pour la formation de l'ADN viral sb.</li> </ul>  <p>La construction de vecteur de clonage dérivé du M13 nécessite :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- l'utilisation de la forme répliquative de l'ADN viral ;</li> <li>- introduction de sites uniques de clonage (SMC) ;</li> <li>- l'introduction de gène rapporteur tel que <i>lacZ'</i> permettant de sélectionner les recombinants par un test coloré.</li> </ul> <p>Exemples de vecteurs dérivés du M13 : M13mp1, M13mp2, M13mp18, M13mp19, ...</p> |

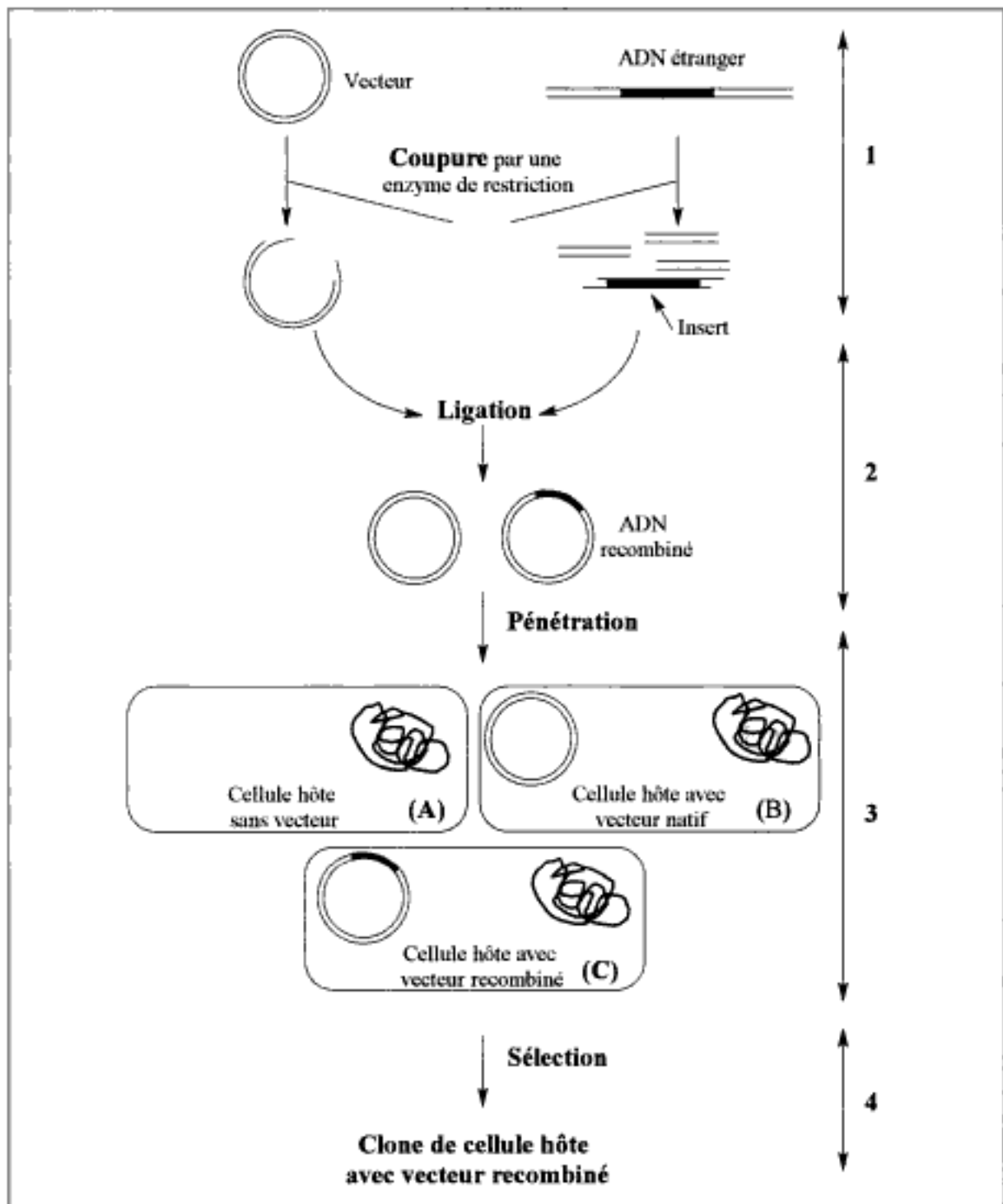
## 8.3. Autres vecteurs

| Cosmides                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | BACs et YACs                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Les <b>cosmides</b> sont des plasmides dans lesquels a été inséré le site <i>cos</i> du phage lambda. Sa présence rend possible l'empaquetage in vitro du plasmide dans la tête du phage lambda.</p> <p>Ils permettent le clonage de fragments jusqu'à 50 kb. Leur incorporation dans les bactéries est plus efficace que les plasmides.</p> | <p><b>BACs</b> : "Bacterial Artificial Chromosomes". Dérivés du plasmide sexuel F. Les fragments clonés pouvant atteindre 200 kb.</p> <p><b>YACs</b> : "Yeast Artificial Chromosomes". Chromosome artificiel de levure comportant un centromère, deux séquences télomériques et des origines de répliquative.</p> <p>Ils peuvent intégrer des fragments dont la taille dépasse 2000 kb.</p> |

## 9. ADN recombinant et clonage

**ADN recombinant** : ADN issu de la ligation in vitro de deux molécules d'ADN d'origines différentes.

**Clonage** : procédé qui consiste à obtenir un grand nombre de cellules (clonage cellulaire) ou de molécules (clonage moléculaire) provenant d'un seul ancêtre.



Différentes étapes du clonage moléculaire de l'ADN

1- Préparation de l'ADN à cloner et du vecteur

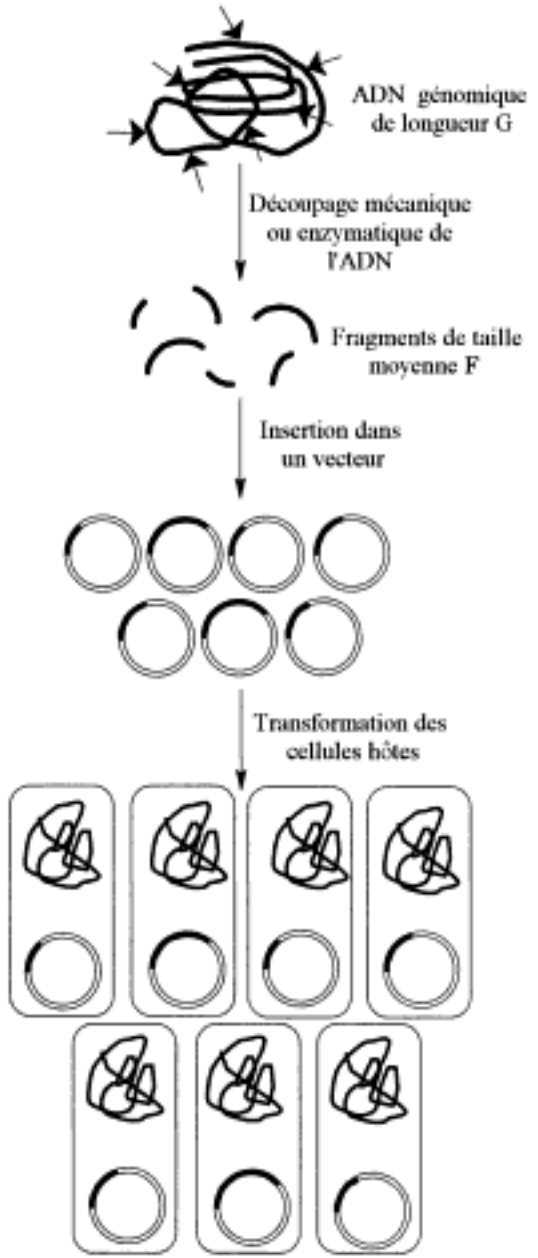
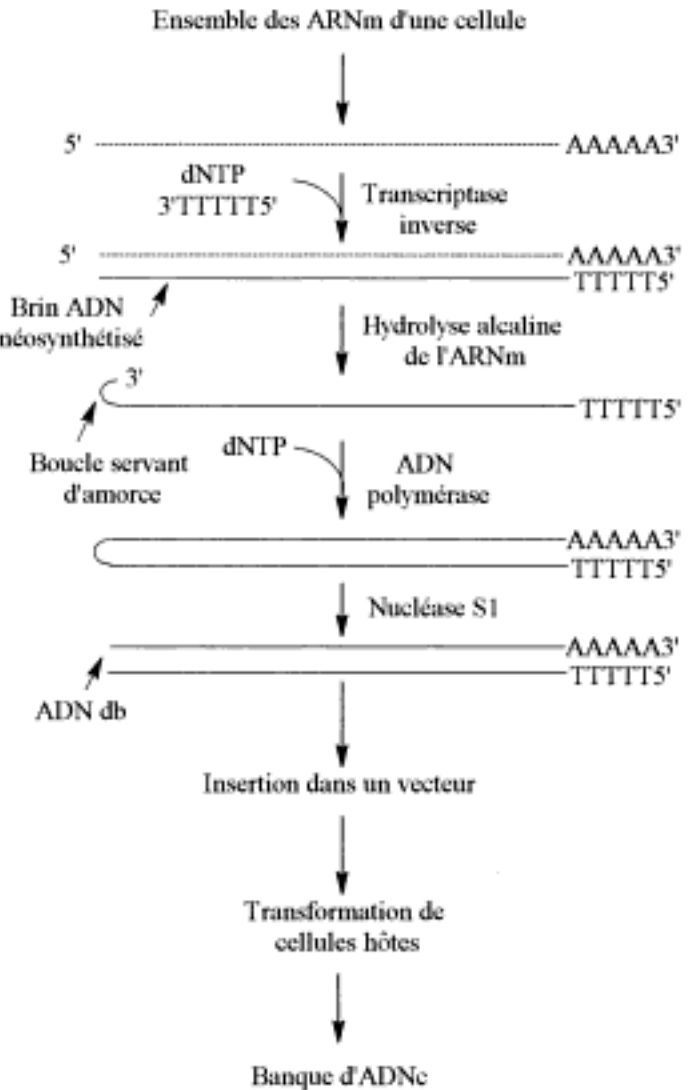
2- Insertion de l'ADN à cloner dans le vecteur

3- Introduction du vecteur recombiné dans une cellule hôte. L'introduction peut échouer (cellule sans vecteur) (A), conduire à une cellule hôte avec un vecteur natif (sans insert) (B) ou conduire à une cellule hôte avec vecteur recombiné (présence de l'insert) (C)

4- Mise en culture et sélection des cellules possédant le vecteur recombiné

## 10. Banques génomiques et banques d'ADNc

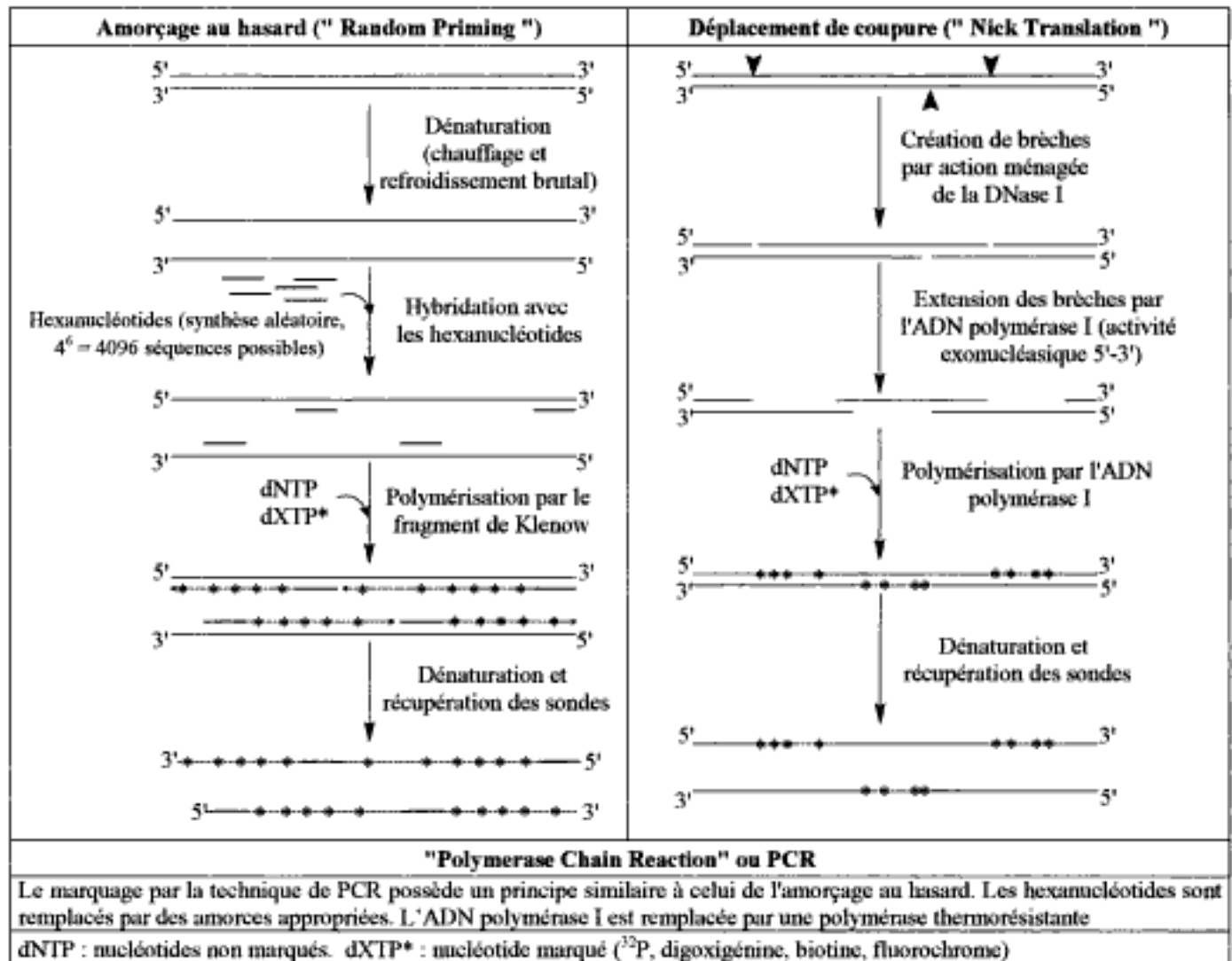
**Banque** : ensemble de cellules dans lesquelles se trouvent clonés l'intégralité des séquences d'une information génétique donnée. On distingue les banques génomiques et les banques d'ADNc.

| Banque génomique                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Banque d'ADNc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- collection de séquences d'ADN issu d'un chromosome ou d'un organisme entier ;</li> <li>- contient les séquences codantes et non codantes.</li> </ul>  <p style="text-align: center;">N clones recombinants</p>                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- collection de séquences d'ADNc issus de la transcription inverse de l'ARNm (utilisation d'une transcriptase inverse ou en anglais, "Reverse Transcriptase") ;</li> <li>- comprend uniquement les séquences transcrites dans la cellule (absence d'introns).</li> </ul>  |
| <p>Le nombre minimum de clones nécessaires pour qu'une séquence quelconque, appartenant à un génome de taille donnée, soit représentée dans la banque avec une probabilité <b>P</b> (0,99 en général) est donné par :</p> $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{F}{G}\right)}$ <p>Dans la pratique, le nombre de clones doit être supérieur à <b>N</b> afin de s'assurer de la présence de fragments chevauchants couvrant ainsi la totalité du génome.</p> | <p>Les séquences partielles des ADNc obtenues sont appelées des <b>EST</b> ("Expressed Sequence Tag")</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

## 11. Sondes moléculaires

**Sonde** : séquence nucléotidique monobrin marquée capable de s'hybrider spécifiquement avec le fragment recherché. Les sondes peuvent être un fragment d'ADN génomique, un ARN (ribosonde), un ADNc ou un oligonucléotide de synthèse.

**Techniques de marquage** : amorçage au hasard, déplacement de coupure, PCR.

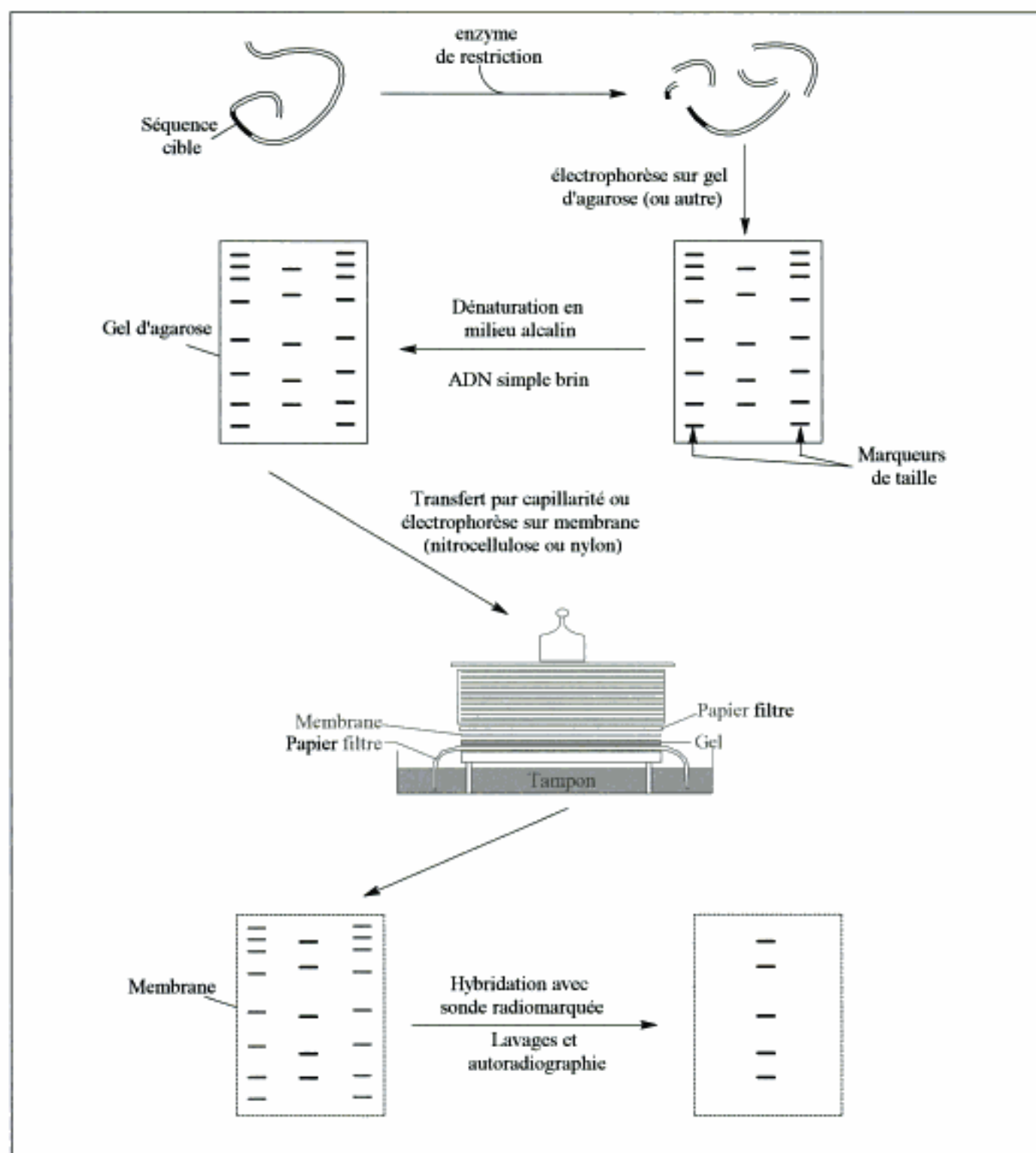


**Marquage** : incorporation d'un atome ou d'un groupement possédant des propriétés particulières permettant sa mise en évidence expérimentale : radioactivité ( $^{32}P$ ), fluorescence (fluorophores : fluorescéine ou rhodamine), ligand (biotine) ou des molécules antigéniques (digoxigénine).

| Marquage                         | Radioactivité                        | Fluorescence                        | Biotine                                                      | Digoxigénine (DIG)                                               |
|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Marqueur                         | dXTP- $^{32}P$                       | dXTP-fluorochrome                   | dXTP-Biotine                                                 | dXTP-Digoxigénine                                                |
| Exemple de système de révélation | Directe : mesure de la radioactivité | Directe : mesure de la fluorescence | Indirecte : streptavidine marquée (enzyme, fluorochrome)<br> | Indirecte : anticorps anti-DIG couplé (enzyme, fluorochrome)<br> |

## 12. Southern-blot

Technique permettant de détecter spécifiquement une séquence nucléotidique d'ADN transférée sur filtre (\* blotting \*) à l'aide d'une sonde (radio)marquée.



Étapes de la technique du Southern-blot. La dénaturation du gel en milieu alcalin provoque la dissociation des fragments d'ADN db en ADN sb seuls accessibles à la sonde d'hybridation. Après le transfert sur nitrocellulose ou nylon l'ADN est fixé par la chaleur (80 °C) ou par traitement aux U.V. Les conditions d'hybridation sont choisies (en particulier, la stringence) pour optimiser les hybridations spécifiques.

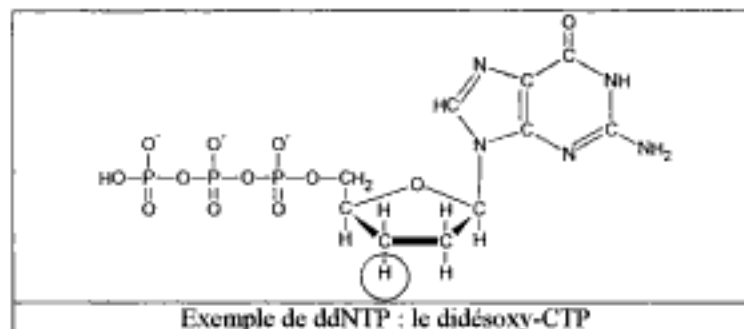
### Variantes :

- **northern blot** : mise en évidence des ARN à l'aide de ribosondes ;
- **western blot** : mise en évidence des protéines à l'aide d'anticorps spécifiques.

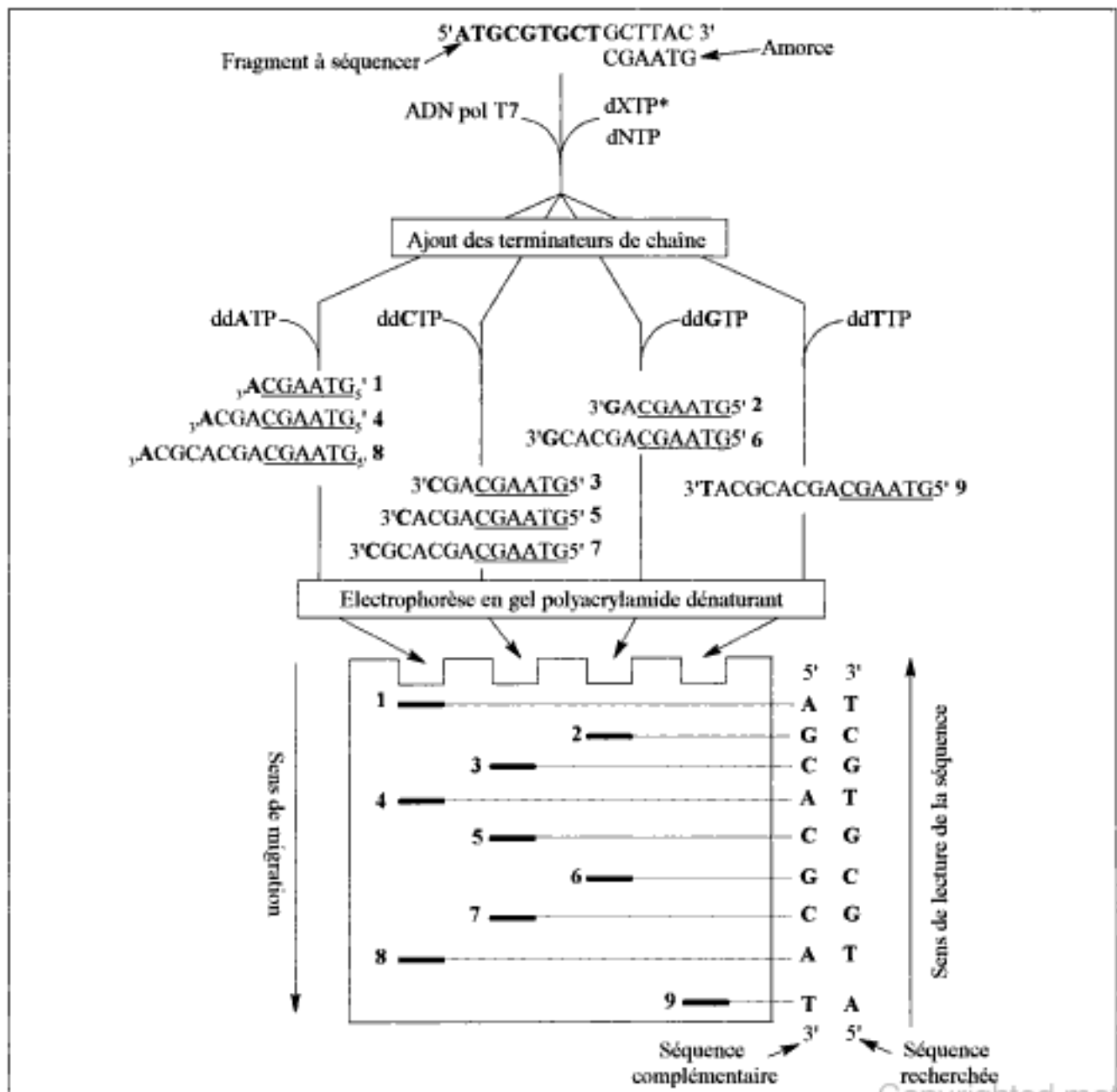
### 13. Séquençage par la méthode de Sanger-Coulson

Détermination de l'enchaînement des nucléotides dans un fragment d'ADN simple brin. La technique comporte deux étapes :

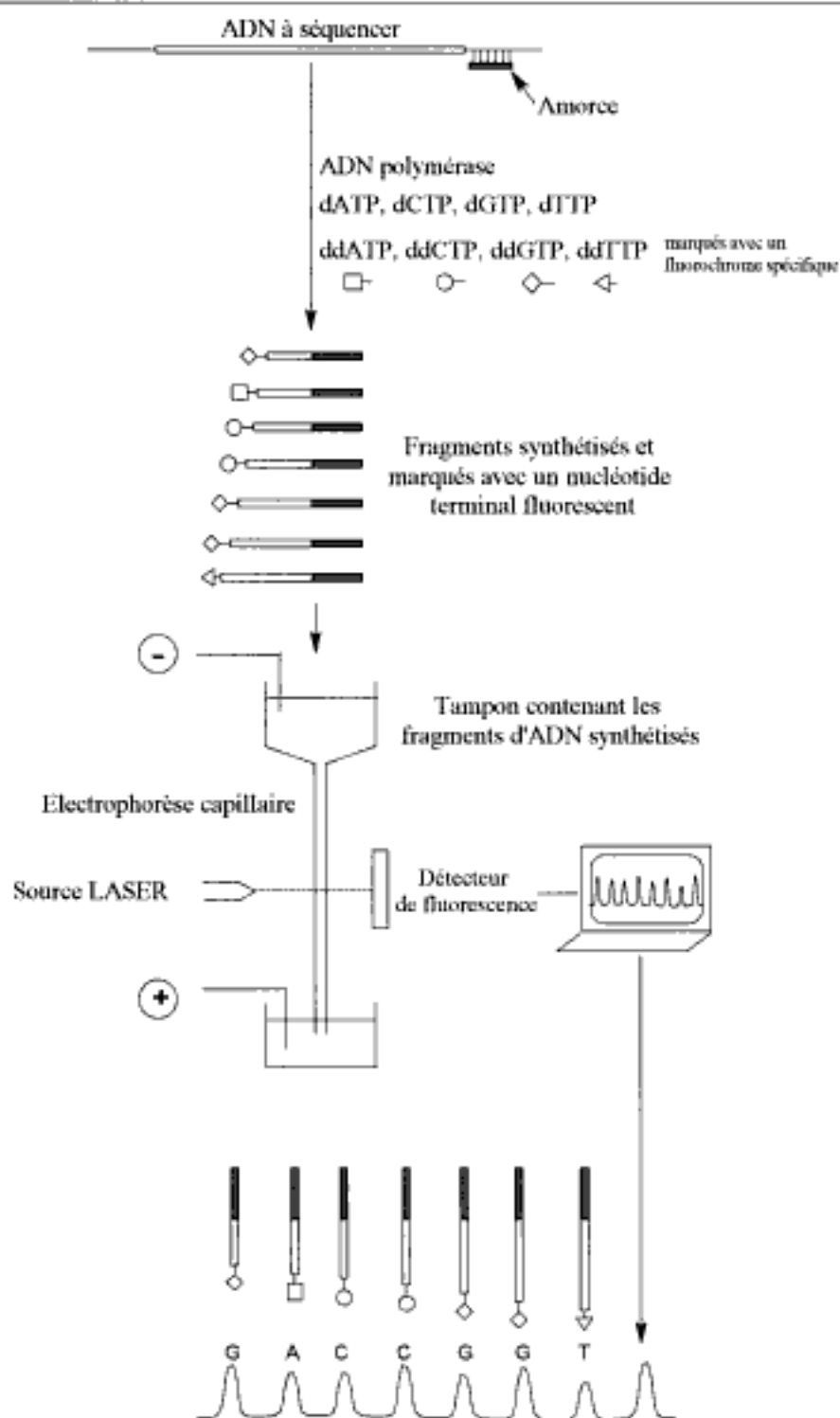
- synthèse du brin complémentaire d'un brin matrice (" template ") à l'aide d'une polymérase à partir d'une amorce, en présence des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dont au moins un est (radio)marqué et d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne (absence de -OH en 3'). Quatre réactions en parallèle sont nécessaires, chacune avec l'un des terminateurs (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) présent en faible quantité :



- séparation, par électrophorèse (PAGE), des fragments synthétisés obtenus. Leur taille dépend du nombre de résidus nucléotidiques, donc de la position des terminateurs dans la séquence.



## 14. Séquençage automatique

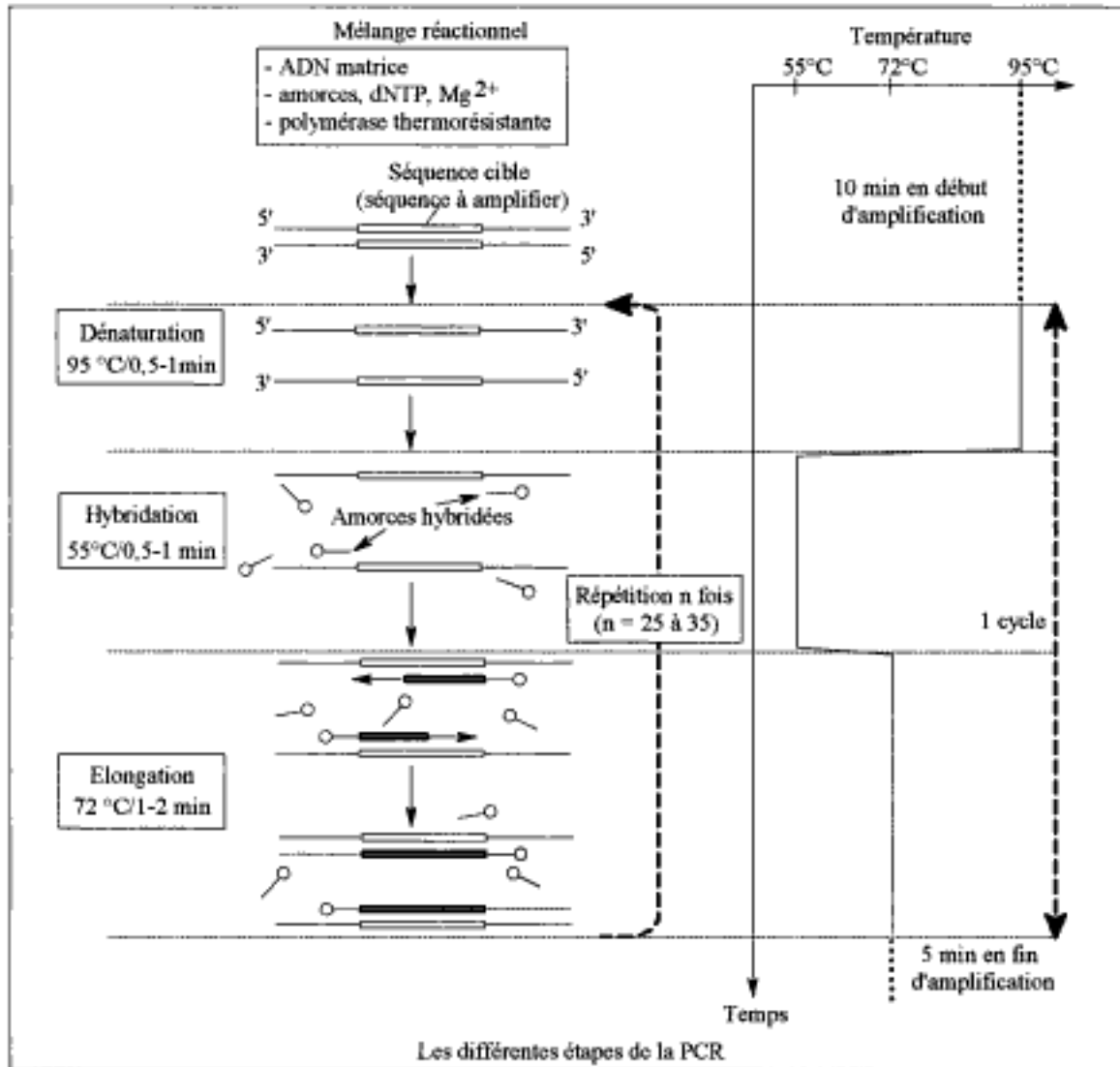


Méthode dérivée de la méthode de Sanger. La réaction se déroule dans un milieu réactionnel unique. Chaque didésoynucléotide est marqué par un fluorochrome spécifique. L'électrophorèse et la détection se font en temps réel. La lecture de la séquence se fait en continu grâce à un LASER et un système informatique. L'utilisation de l'électrophorèse capillaire permet d'améliorer la résolution et la rapidité de la séparation. (D'après Atlas de biotechnologie et de génie génétique. ISBN : 2-257-12118-X)

## 15. Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP) ou " Polymerase Chain Reaction " (PCR)

### 15.1. PCR standard (point final)

Amplification d'une séquence d'ADN (1 à 2 kb) délimitée par des amorces spécifiques. L'ADN polymérase utilisée est thermorésistante ce qui permet une automatisation des cycles d'amplification. Elle ne possède pas de fonction d'édition (activité exonucléasique 3' → 5' permettant la correction des erreurs de copie " proofreading "), elle commet une erreur toutes les 10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> bases.



### 15.2. Devenir des produits d'amplification

- Mise en évidence :

- \* électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) (et révélation au bromure d'éthidium) ;
- \* électrophorèse sur gel d'agarose (et hybridation avec une sonde marquée (Southern blot)) ;
- \* HPLC et révélation sous U.V.

- Séquençage : détermination de la séquence de l'amplicon servant de matrice (un seul brin est copié)

- Clonage : insertion dans un vecteur de clonage

### 15.3. Techniques dérivées

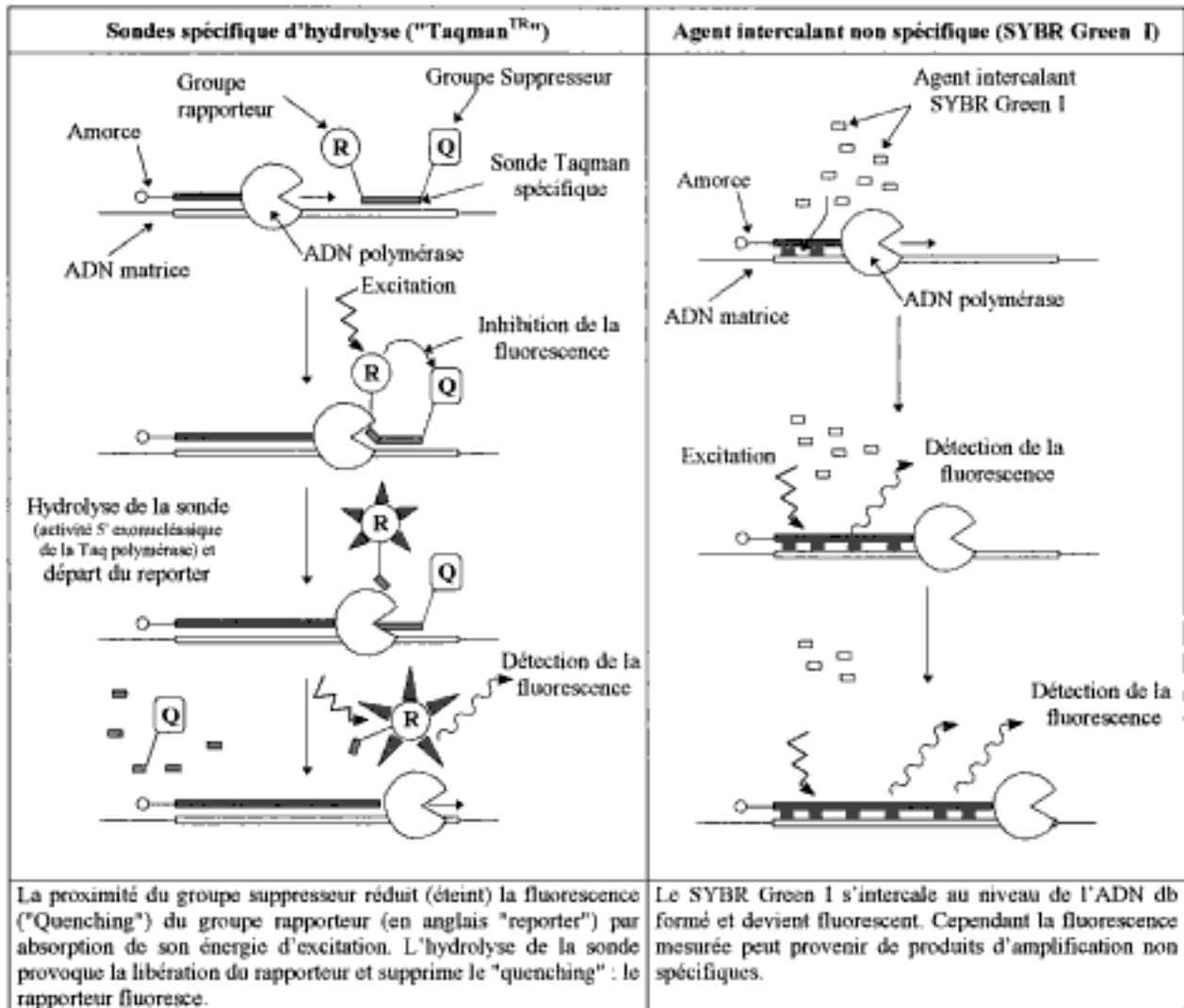
- RT-PCR ("Reverse Transcription - PCR") : transcription de l'ARN en ADNc à l'aide de la transcriptase inverse suivie d'une PCR standard. Utilisée dans l'analyse des produits de transcription en particulier pour les ARNm peu abondants.

- Multiplexe-PCR : amplification simultanée de plusieurs segments d'ADN différents grâce à plusieurs couples d'amorces spécifiques. Permet de réduire la quantité d'ADN nécessaire à plusieurs analyses.



## 15.4. PCR quantitative en temps réel

La réaction d'amplification est suivie au fur et à mesure de son déroulement par mesure de la fluorescence émise. L'augmentation de la fluorescence est directement liée au nombre de copies initiales.

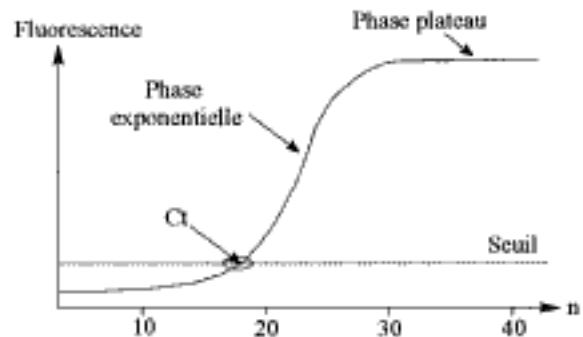


Les réactions sont caractérisées par le moment où le produit est détecté pour la première fois, plutôt que par la quantité de produit accumulée en fin de la réaction. On définit ainsi le nombre de cycles seuil  $C_t$  ("Cycle threshold"). Il correspond au nombre de cycles nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence donné. La quantité d'ADN est déterminée par comparaison des  $C_t$  avec un témoin ou à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

L'évolution du nombre de copies ( $N$ ) en phase exponentielle (donc de la fluorescence) en fonction du nombre de cycles ( $n$ ) est donnée par :  $N = N_0 \cdot (E+1)^n$

avec :

- $N_0$  : nombre de copies initiales ;
- $E$  : efficacité de la PCR ( $E \leq 1$ ).



### 15.5. Critères d'optimisation des amorces pour la PCR

L'optimisation des amorces doit tenir compte des paramètres suivants :

- taille des amorces : elle influe sur la température d'hybridation et sur la spécificité ; en général, 18 à 30 nucléotides ;
- spécificité : les amorces doivent correspondre à des séquences uniques dans l'ADN matrice ;
- possibilité de formation de duplex : nécessité d'absence de zones de complémentarité inter-amorces ;
- possibilité de formation de structures secondaires : nécessité d'absence de zones de complémentarité intra-amorces (< 3 bases) ;
- contenu en G + C : il doit être compris entre 40 à 60 % ;
- Tm des duplex amorces ADN : elles doivent être proches et comprises entre 52 et 65 °C.

La détermination du Tm des duplex amorces ADN est très importante car elle influe sur le choix de la température d'hybridation.

#### 15.5.1. Détermination de la température de fusion Tm

##### Méthodes de base (Règle de Wallace)

$$T_m = 4 \cdot (nG + mC) + 2 \cdot (pA + qT)$$

avec : n, m, p et q le nombre de bases G, C, A et T respectivement.

Cette formule donne une bonne estimation pour les séquences dont la taille est inférieure à 14 bases.

Pour des séquences supérieures à 14 bases, on utilise parfois la relation :

$$T_m = 64,9 + 41 \cdot (nG + mC) - 16,4 / L$$

avec L : longueur de l'oligonucléotide.

##### Méthode tenant compte de la concentration en sels monovalents

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot \log([M^+]) + 0,41 \cdot (\%GC) - 675 / L$$

Avec : - L : longueur de l'oligonucléotide ;

- % GC : pourcentage de G + C ;

- [M<sup>+</sup>] : concentration en sels monovalents (exemple : Na<sup>+</sup>).

Cette méthode est utilisée pour les longues séquences (>20 bases) en particulier les amplicons.

##### Méthode thermodynamique

Les méthodes précédentes tiennent compte uniquement de la composition en bases. La valeur de Tm dépend également de la séquence en bases et des forces d'empilement des bases. La méthode thermodynamique est basée sur le modèle du plus proche voisin ("nearest-neighbour base model") et elle utilise des critères énergétiques ( $\Delta H$  et  $\Delta S$ ) de la formation et de la propagation de l'hélice. Elle constitue la méthode de choix pour la détermination des Tm des amorces pour PCR. Elle est utilisée dans la plupart des logiciels de détermination des amorces.

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \cdot \ln(C/4)} - 273,15 + 16,6 \cdot \log[M^+]$$

avec : -  $\Delta H$  : somme des enthalpies libres des couples de bases voisines (cal.mol<sup>-1</sup>) ;

-  $\Delta S$  : somme des entropies des couples de bases voisines (cal.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>) ;

- C : concentration de l'oligonucléotide (mol.L<sup>-1</sup>) ;

- [M<sup>+</sup>] : concentration en sels monovalents (mol.L<sup>-1</sup>) ;

- R : constante des gaz parfaits, 1,987 cal.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>.

$\Delta H$  et  $\Delta S$  sont données par des tables thermodynamiques.

#### 15.5.2. Détermination de la température d'hybridation Ta de la réaction

Elle dépend des Tm des amorces et de l'amplicon. La plupart des logiciels utilisent la relation suivante :

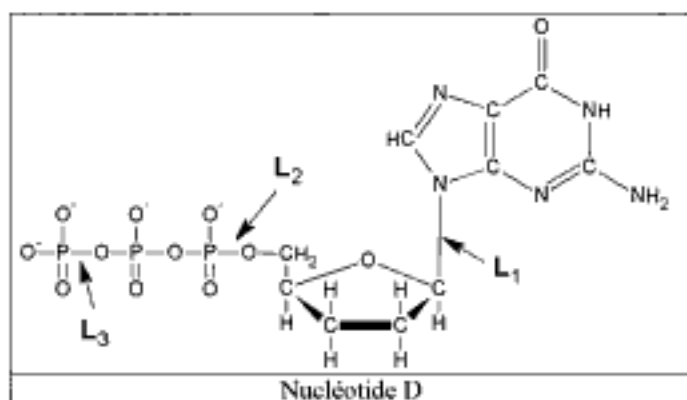
$$T_a = 0,3 \cdot T_m(\text{amorce}) + 0,7 \cdot T_m(\text{amplicon}) - 14,9$$

## Énoncés des exercices

Les exercices dont le titre est en bleu sont de niveau post-baccalauréat.

### Exercice 1 Structure d'un nucléotide D

Soit le nucléotide suivant :



1. La base azotée constitutive de ce nucléotide est-elle de nature purique ou pyrimidique ? Nommer cette base.
2. Quels sont les groupements de la base capables d'établir des liaisons hydrogène ? Effectuer un schéma illustrant cet aspect.
3. Nommer le pentose constitutif de ce nucléotide.
4. Nommer les liaisons  $L_1$ ,  $L_2$  et  $L_3$ .
5. Est-il possible de synthétiser un polyméridé artificiel à l'aide d'une polymérase ? Justifier la réponse.

### Exercice 2 Etude d'un dinucléotide A

1. Ecrire la réaction de condensation entre deux molécules de désoxyATP (dATP). Nommer la liaison formée entre les deux molécules de dATP.
2. Calculer la masse molaire moléculaire du dinucléotide obtenu.
3. Quel est l'atome de phosphore du dATP qui doit être marqué au  $^{32}\text{P}$ , si l'on souhaite obtenir le dinucléotide marqué radioactivement au niveau de la liaison formée entre les deux molécules de dATP ?

Données : formules brutes et masses molaires moléculaires des molécules constitutives du dATP :

adénine :  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$  ( $M = 135 \text{ g.mol}^{-1}$ ), phosphate :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $M = 98 \text{ g.mol}^{-1}$ ), désoxyribose :  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$  ( $M = 134 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

### Exercice 3 Le génome de *Bacillus subtilis*

Le séquençage du génome de *Bacillus subtilis* a été achevé en 1997. Il a une taille de 4214814 paires de bases et contiendrait 4225 gènes, dont 4107 coderaient pour des protéines. Le pourcentage de guanine et cytosine (% G + C) de ce génome est de 60 %.

1. Quel est l'intérêt de déterminer le pourcentage de guanine et cytosine ?
2. Déterminer le pourcentage de chacune des bases constitutives de cet ADN.
3. Estimer la masse molaire moléculaire de cet ADN, sachant que la masse molaire moléculaire moyenne d'un résidu nucléotidique est de  $330 \text{ g.mol}^{-1}$ .
4. Quelle est la longueur d'une telle molécule, sachant qu'un ADN de type B possède 10 paires de bases par tour d'hélice et que le pas de l'hélice est de 3,4 nm.
5. En assimilant l'ADN (diamètre = 0,002  $\mu\text{m}$ ) et la cellule bactérienne (longueur = 5  $\mu\text{m}$ , diamètre = 2  $\mu\text{m}$ ) à des cylindres, comparer le volume de l'ADN à celui de la cellule.
6. Quelle est la masse, exprimée en pg, d'une telle molécule d'ADN ?
7. Quelle est la quantité d'ADN, exprimée en  $\mu\text{g}$ , pouvant être extraite à partir de 1 ml. d'une suspension bactérienne à  $10^9 \text{ cellules.mL}^{-1}$  ?

Donnée : nombre d'Avogadro  $N = 6,02 \cdot 10^{23}$  molécules par mole.

Hidden page

**Exercice 7** Etablissement de la carte de restriction d'un plasmide

On se propose d'établir la carte de restriction d'un plasmide circulaire double brin avec les enzymes *Pst* I et *EcoR* V.

1. Quelle est la propriété principale des sites de reconnaissance des enzymes de restriction ?
2. Schématiser les réactions catalysées par les enzymes *Pst* I et *EcoR* V. Comment nomme-t-on les extrémités obtenues ?
3. Quelle est la probabilité théorique de trouver un site de coupure de l'ADN par *Pst* I ou *EcoR* V en supposant que la composition et la répartition des bases soient aléatoires ? Quelle serait la taille des fragments ainsi générés ?
4. La digestion du plasmide par *Pst* I et *EcoR* V donne les résultats suivants :

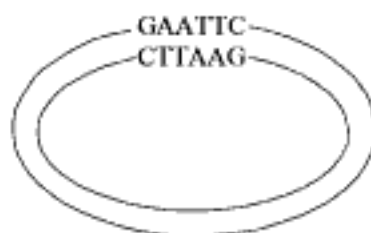
| Enzymes utilisées             | Taille des fragments en kpb |     |     |     |     |
|-------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| <i>EcoR</i> V                 | 4,2                         | 3,4 |     |     |     |
| <i>Pst</i> I                  | 3,6                         | 2,7 | 1,3 |     |     |
| <i>Pst</i> I et <i>EcoR</i> V | 2,2                         | 2   | 1,4 | 1,3 | 0,7 |

Établir la carte de restriction de ce plasmide sachant que les sites de restriction pour *Pst* I et *EcoR* V sont respectivement les suivants :

- *Pst* I : CTGCA↑G ;
- *EcoR* V : GAT↑ATC.

**Exercice 8** Action d'enzymes sur le plasmide pBR322

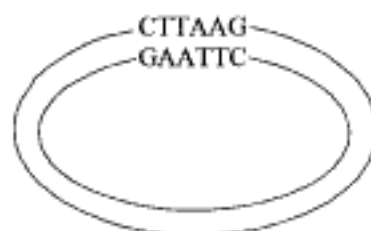
Le plasmide pBR322 possède un site unique de restriction pour *EcoR* I. Le plasmide est schématisé ci-dessous :



On réalise successivement sur le plasmide les manipulations suivantes :

- traitement par *EcoR* I ;
- incubation avec la polymérase I en présence de dATP et de dTTP ;
- incubation avec la ligase T4 en présence d'ATP.

1. Schématiser les réactions enzymatiques effectuées et conclure.
2. Quel serait le produit obtenu si le site de restriction était orienté comme suit :



Donnée : site de coupure d'*EcoR* I : G↑AATTC.

**Exercice 9** Clonage d'un fragment d'ADN dans le plasmide pUC18

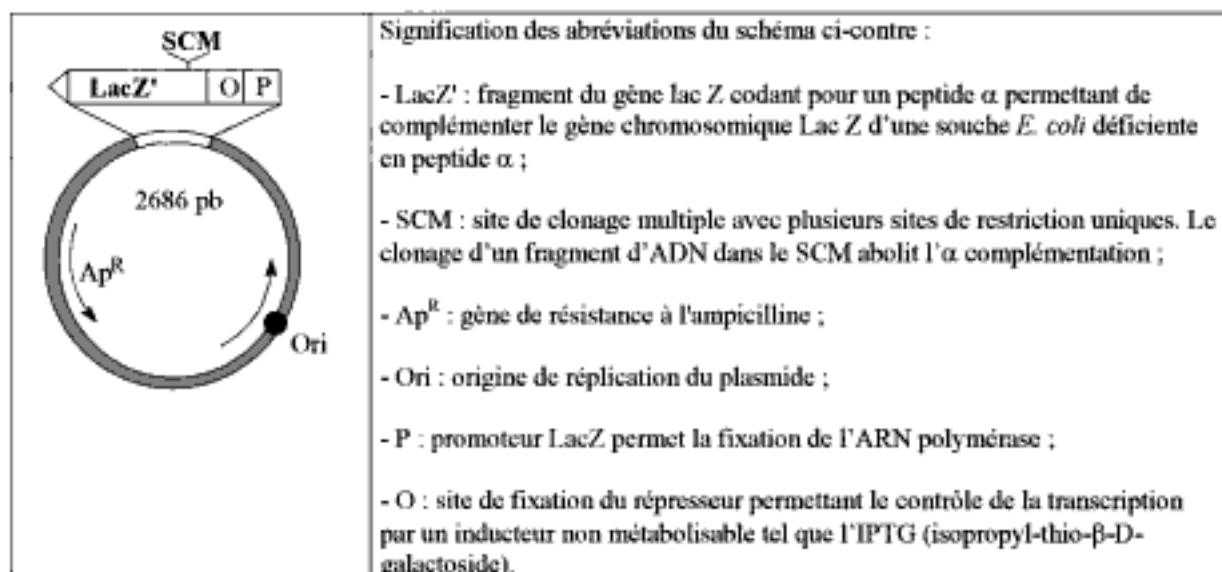
Afin de cloner un segment d'ADN circulaire double brin dans le plasmide pUC18, on réalise les opérations suivantes :

- traitement de l'ADN à cloner avec l'enzyme de restriction *EcoR* I ;
- traitement du plasmide pUC18 (voir figure ci-dessous) avec la même enzyme ;
- incubation de l'ADN à cloner et du plasmide traités par *EcoR* I en présence de ligase T4 et d'ATP.

On répète la même expérience avec les enzymes de restriction suivantes : *Bam*HI, *Xba*I et *Hind* III.

Les plasmides recombinants sont incubés en présence d'une souche d'*E. coli* Amp<sup>S</sup>, LacZ' (β-galactosidase inactive, car dépourvue du peptide α - l'apport du peptide dans le milieu de culture restaurant l'activité de l'enzyme). Les bactéries sont ensuite cultivées sur une gélose contenant de l'ampicilline (antibiotique), de l'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside, inducteur de l'opéron lactose, non métabolisable) et du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-thiogalactoside, substrat incolore devenant bleu après hydrolyse par la β-galactosidase).

Tous les types de colonies cultivant sur le milieu Amp-IPTG-X-gal sont isolés et leur ADN plasmidique extrait sous forme superenroulée. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de déterminer la taille de chaque plasmide.



Les résultats des ces expériences sont consignés dans le tableau suivant :

| Enzyme utilisée | Type de colonies | Taille de l'ADN plasmidique en kpb |
|-----------------|------------------|------------------------------------|
| <i>EcoR</i> I   | A : bleue        | 2,69                               |
|                 | B : blanche      | 3,00                               |
|                 | C : blanche      | 3,28                               |
| <i>Xba</i> I    | A : bleue        | 2,69                               |
| <i>Hind</i> III | A : bleue        | 2,69                               |
|                 | B : blanche      | 2,92                               |
|                 | C : blanche      | 2,81                               |
|                 | D : blanche      | 3,29                               |
| Aucune          | A : bleue        | 2,69                               |

1. Quel est le rôle de l'ampicilline au cours de ces expériences ?
2. A quoi correspond une colonie bleue ? Une colonie blanche ?
3. Quel est l'intérêt de réaliser une expérience sans utiliser d'enzyme de restriction ?
4. Déterminer la taille de l'ADN inséré dans chaque cas.
5. Quelle est la taille du fragment d'ADN concerné ?
6. Comment interpréter le résultat obtenu avec l'enzyme de restriction *Xba* I ?

#### Exercice 10 Modélisation du phénomène d'amplification par PCR

L'amplification par PCR est un phénomène exponentiel (progression géométrique de raison 2).

1. Écrire la relation donnant le nombre de copies totales " N " en fonction du nombre de cycles " n ".
2. Lors des premiers cycles, la réaction génère des amplicons dont la taille est supérieure à la taille de la séquence cible. Ces amplicons parasites continuent d'être amplifiés tout au long de la réaction mais à une vitesse moindre que celle de la séquence cible (vitesse assimilable à une progression arithmétique de raison 2).

Quelle serait alors la relation qui donne le nombre de copies de la séquence cible uniquement ?

3. Quel est le nombre de copies de la séquence cible au 25<sup>ème</sup> cycle ? Quel est le facteur d'amplification alors obtenu ?
4. L'équation définie à la question 2 suppose que l'efficacité de la réaction est de 100 %. Cette valeur n'est jamais atteinte expérimentalement. La relation qui décrit le nombre de copies en fonction de l'efficacité et le nombre de cycles devient :  $N = N_0 \cdot (1+E)^n$ , avec :

- N : nombre de copies ;
- $N_0$  : nombre de molécules avant amplification ;
- n : nombre de cycles ;
- E : efficacité de la réaction d'amplification dont la valeur est  $\leq 1$ .

Une solution d'ADN contient  $2 \cdot 10^3$  copies d'une séquence d'intérêt. La réaction a une efficacité de 88 % ( $E = 0,88$ ).

Quel est le nombre de cycles nécessaires pour obtenir  $2 \cdot 10^8$  copies ?

**Exercice 11** Choix des amorces pour PCR

On se propose d'amplifier par PCR un fragment nucléotidique de 118 à 288 inclus de la séquence suivante :  
La taille des amorces est de 21 bases.

|    |            |             |            |            |            |            |     |
|----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 5' | GAATCCCACG | GTAAATTGGA  | ACACAAGGAT | ATTCCAGTTC | CAAAGCCAAA | GGCCAACGAA | 60  |
|    | TTGTTGATCA | ACGTTAAGTA  | CTCTGGTGTC | TGTCACACCG | ACTTGCACGC | TTGGCACGGT | 120 |
|    | GACTGGCCAT | TGCCAGTTAA  | GCTACCATTA | GTCGGTGGTC | ACGAAGGTGC | CGGTGTCGTT | 180 |
|    | GTCGGCATGG | GTGAAAACGT  | TAAGGGCTGG | AAGATCGGTG | ACTACGCCGG | TATCAAATGG | 240 |
|    | TTGAACGGTT | CTTGTATGGC  | CTGTGAATAC | TGTGAATTGG | GTAACGAATC | CAACTGTCCT | 300 |
|    | CACGCTGACT | TGTCCTGGTTA | CACCC      | 3'         |            |            | 325 |

1. Quelle sera la taille du segment amplifié sans tenir compte des amorces ? En tenant compte de ces amorces ?
2. Indiquer la structure des amorces de 21 bases nécessaires pour amplifier le segment désigné.
3. Rappeler les critères de choix des amorces.
4. Calculer la température de fusion " Tm " de chaque amorce en utilisant la relation :  $T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$  en °C où A est le nombre d'adénine, T de thymine, G de guanine et C de cytosine.
5. Calculer la température de fusion " Tm " de chaque amorce en utilisant la relation de la méthode thermodynamique du plus proche voisin. Conclure.

Site recommandé pour déterminer la Tm : <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>

Remarque : par convention, on raisonne sur le monobrin pour ce qui concerne les amorces. Le monobrin va évidemment s'apparier ensuite avec le brin complémentaire.

**Exercice 12** PCR et empreintes génétiques

L'ADN humain comporte des séquences non codantes répétées en tandem (VNTR : " Variable Number of Tandem Repeats ") appelées minisatellites. Cet ADN, dispersé dans tout le génome, est hautement variable d'un individu à un autre (polymorphisme de répétition) fournissant un excellent outil pour les tests de paternité et les enquêtes criminelles.

Le locus D1S80 est un minisatellite hautement polymorphe situé sur le bras court du chromosome 1 chez l'homme. Son organisation pour un individu portant les allèles N° 4 et N° 2 est schématisée ci-dessous :

**VNTR D1S80**

Le tableau ci-dessous indique la fréquence de certains allèles dans la population américaine d'origine caucasienne :

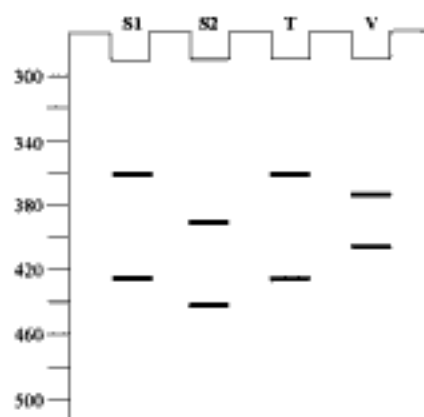
| Numéro des allèles (N°) | Nombre de répétitions (n) | Fréquence des allèles américains d'origine caucasienne |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1                       | 18                        | 0,293                                                  |
| 2                       | 19                        | 0,011                                                  |
| 3                       | 20                        | 0,021                                                  |
| 4                       | 21                        | 0,032                                                  |
| 5                       | 22                        | 0,043                                                  |
| 6                       | 23                        | 0,016                                                  |
| 7                       | 24                        | 0,335                                                  |
| 8                       | 25                        | 0,037                                                  |

1. Déterminer quelle est la fréquence d'un génotype 2/4 pour le locus D1S80 ? Celle d'un génotype 2/2 pour le locus D1S80 ?
2. Sachant que le locus D1S80 possède 28 allèles connus, quel est le nombre de génotypes possibles ? Le nombre de génotypes hétérozygotes ?
3. La recherche des différents allèles du locus D1S80 est réalisée grâce à une amplification PCR avec des amorces spécifiques qui reconnaissent des séquences identiques encadrant le locus du minisatellite. Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Exprimer la taille approximative du fragment amplifié en fonction du nombre de répétition n.

## 4. Application :

Le locus D1S80 est utilisé pour élucider une affaire de viol. Les enquêteurs relèvent une trace (T) de sperme sur les habits de la victime. Les sangs des deux suspects (S1 et S2) et de la victime (V) sont également analysés par électrophorèse. Les résultats figurent dans le schéma ci-dessous :



- 4.1. Expliquer l'intérêt d'utiliser la PCR dans les affaires criminelles ?
- 4.2. Expliquer pourquoi l'analyse du sperme contenant des cellules haploïdes donne également deux bandes.
- 4.3. Analyser le résultat des empreintes génétiques. Peut-on conclure à la culpabilité de l'un des deux suspects ?
- 4.4. Quelles analyses supplémentaires doit-on effectuer pour confondre le suspect ?
- 4.5. Peut-on utiliser les mêmes fréquences alléliques si l'un des suspects est afro-américain ?
- 4.6. Quelles conclusions peut-on tirer si l'analyse de la trace de sperme montre 4 bandes ?

Remarque. D1S80 : D désigne DNA, 1 désigne le numéro du chromosome, S pour single copy, 80 : numéro du locus.

Données :

- les amorces utilisées ont des tailles de 28 et 29 bases ;
- loi de Hardy-Weinberg : la fréquence d'un génotype hétérozygote est donnée par la formule  $f = 2 \cdot p \cdot q$  avec p et q les fréquences alléliques ;
- la fréquence d'un génotype homozygote est donnée par la formule :  $f = p^2$  ;
- le nombre de génotypes possibles est donnée par la relation :  $(a^2 + a) / 2$  avec a : nombre d'allèles.

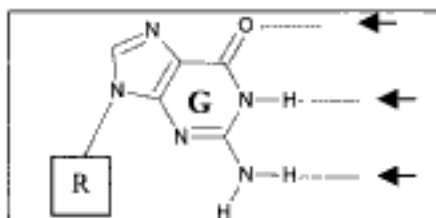


## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Structure d'un nucléotide D

1. Il s'agit d'une base purique, la guanine.

2. La guanine est susceptible d'établir trois liaisons hydrogène. Le schéma ci-dessous illustre cet aspect (les flèches indiquent la position des liaisons hydrogène - voir également le résumé du cours pour la visualisation complète des liaisons hydrogène) :



3. Il s'agit du  $\beta$ -D-2',3'-didésoxyribofuranose (didésoxyribose).

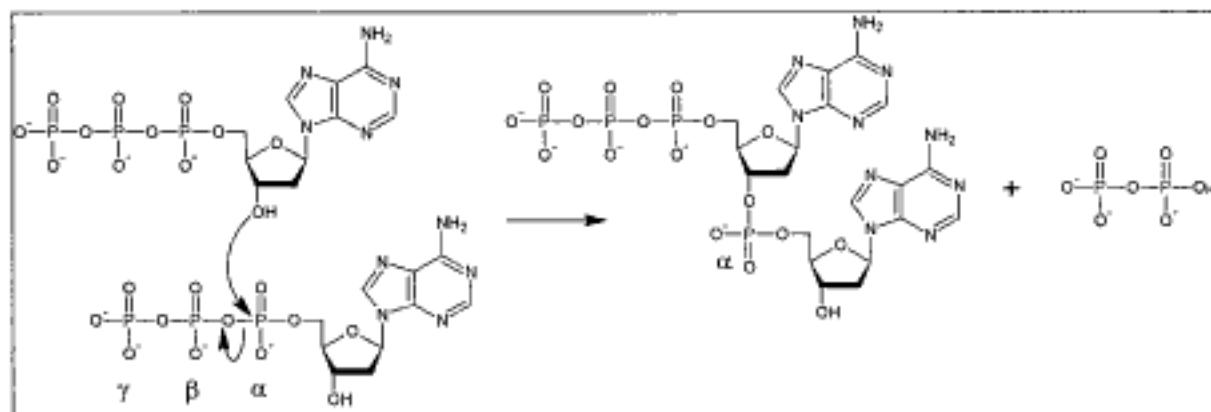
4. Les noms des liaisons sont les suivants :

- $L_1$  : liaison  $\beta$ -N-glycosidique (anomère  $\beta$  : le groupement pseudo-aldéhyde du carbone 1' du didésoxyribose est en position  $\beta$ ) ;
- $L_2$  : liaison phosphoester en position 5' du didésoxyribose ;
- $L_3$  : liaison anhydride phosphate (à haut potentiel d'hydrolyse). Cette liaison ne doit pas être confondue avec une liaison phosphoester.

5. L'absence d'extrémité 3'-OH libre ne permet pas d'envisager la synthèse de polyD. Un tel nucléotide peut être utilisé comme terminateur lors du séquençage de l'ADN (voir méthode de Sanger).

### Exercice 2 Etude d'un dinucléotide A

1. La réaction de condensation est détaillée dans le schéma ci-dessous. La liaison entre les deux moles de dATP est une liaison 3'-5' phosphodiester.



2. Calcul de la masse molaire moléculaire d'une mole de dinucléotide

Pour ce calcul, on considérera la molécule sous sa forme non ionisée (forme acide, c'est à dire protonée).

Le dinucléotide comporte comme molécules constitutives : l'adénine (présente 2 fois), le désoxyribose (présent 2 fois), le phosphate (présent 4 fois). Entre ces 8 molécules constitutives du dinucléotide, il y a création de 7 liaisons avec élimination de 7 molécules d'eau.

La masse molaire moléculaire  $M$  de la forme non ionisée s'établit alors aisément :

$$M = 2 \cdot 135 + 2 \cdot 134 + 4 \cdot 98 - 7 \cdot 18 = 804 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

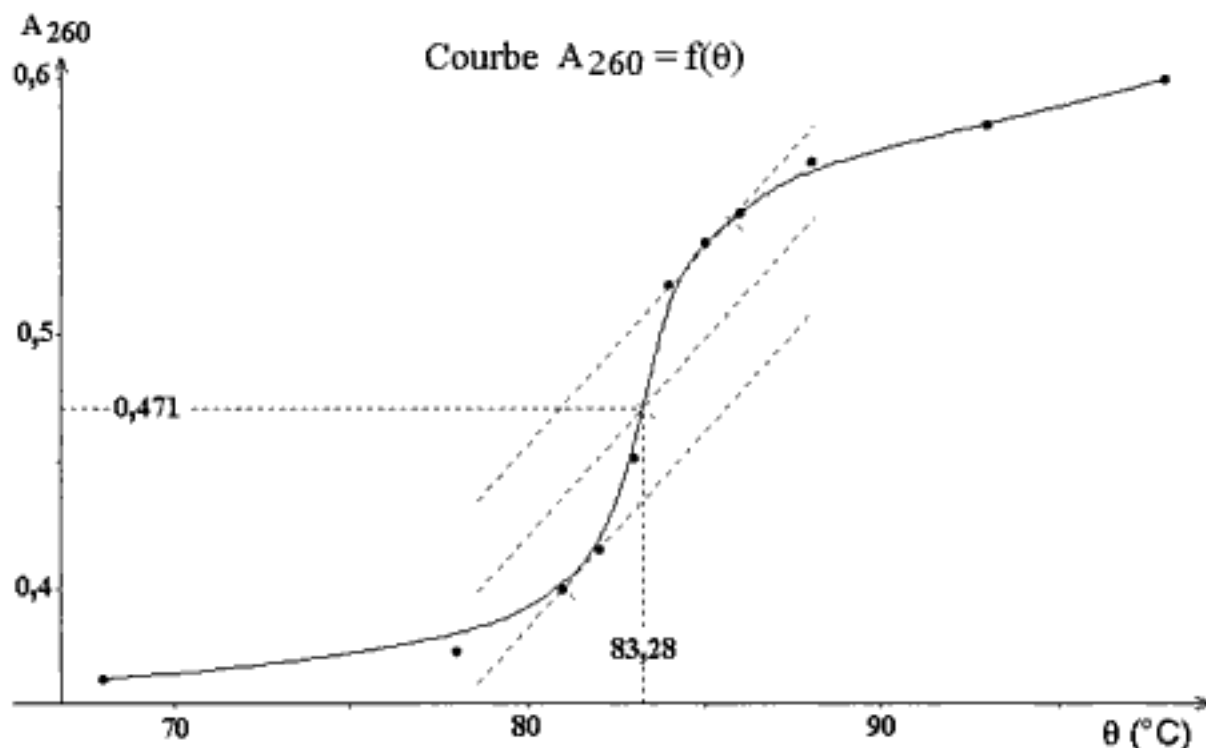
3. Il y a marquage radioactif au niveau du phosphore de la liaison phosphodiester si le dATP utilisé pour la condensation est marqué au  $^{32}\text{P}$  sur le P en  $\alpha$ .

**Exercice 3** Le génome de *Bacillus subtilis*

1. Le % G + C est un critère important de classification des microorganismes, c'est un critère taxonomique.
2. Détermination du pourcentage de chacune des bases constitutives de l'ADN : G + C = 60 %, donc G = C = 30 % et A + T = 40 %, donc A = T = 20 %.
3. Estimation de la masse molaire moléculaire M de l'ADN :  $M = 4214814 \cdot 330 \cdot 2 = 2,78 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .
4. Calcul de la longueur d'une telle molécule :  $4214814 / 10 = 421481$  tours d'hélice et par conséquent la longueur L est de :  $421481 \cdot 3,4 \text{ nm} = 1433035 \text{ nm}$  ou 1,43 mm.  
Or *Bacillus subtilis* mesure environ 5  $\mu\text{m}$ , il est clair que l'ADN se trouve sous forme compactée (en supérahélice).
5. Comparaison des volumes de l'ADN et de la cellule :
  - volume occupé par l'ADN (cylindre de 1,43 mm soit 1430  $\mu\text{m}$  de longueur L et de 0,001  $\mu\text{m}$  de rayon R)  
 $V_{\text{ADN}} = \pi \cdot L \cdot R^2 = \pi \cdot 1430 \cdot (0,001)^2 = 4,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^3$ ;
  - volume de la cellule (cylindre de 5  $\mu\text{m}$  de longueur L et de 1  $\mu\text{m}$  de rayon r)  
 $V_{\text{cell}} = \pi \cdot L \cdot r^2 = \pi \cdot 5 \cdot 1^2 = 15,5 \mu\text{m}^3$ .
 Conclusion : le volume occupé par l'ADN dans la cellule est très faible.
6. Calcul de la masse d'une molécule d'ADN : masse molaire moléculaire / N =  $2,78 \cdot 10^9 / 6,02 \cdot 10^{23} = 4,62 \cdot 10^{-15} \text{ g} = 4,62 \cdot 10^{-3} \text{ pg}$ .
7. Calcul de la quantité d'ADN pouvant être extraite à partir d'un 1 mL de suspension bactérienne :  $4,62 \cdot 10^{-3} \cdot 10^9 = 4,62 \cdot 10^6 \text{ pg} = 4,62 \cdot 10^{-6} \text{ g} = 4,62 \mu\text{g}$ .

**Exercice 4** Dénaturation thermique d'un ADN bactérien

1. Tracé de la courbe  $A_{260} = f(\theta)$  :



La température de fusion déterminée par la méthode des tangentes est  $T_m = 83,28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

2. Le passage de l'ADN de la forme double brin à la forme simple brin s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance à 260 nm. Il s'agit du phénomène d'hyperchromicité consécutif à la rupture des liaisons hydrogène et des forces d'empilement des bases. Les bases démasquées entrent en contact avec le solvant et montrent une augmentation de l'absorbance à 260 nm. Il s'agit d'un phénomène coopératif, d'où l'aspect sigmoïdal de la courbe.

3. Dans le cas d'un ADN simple brin, il y aurait une faible augmentation de l'absorbance. La représentation  $A_{260} = f(\theta)$  serait linéaire (voir résumé du cours).
4. A la température  $T_m$ , il y a 50 % de l'ADN sous forme double brin et 50 % de l'ADN sous forme simple brin ; à  $T_m - 5^\circ\text{C}$ , l'ADN se trouve essentiellement sous forme double brin et à  $T_m + 5^\circ\text{C}$ , l'ADN se trouve essentiellement sous forme simple brin.
5. Les régions riches en A + T s'ouvrent par augmentation de la température avant les régions riches en G + C. La rupture des deux liaisons hydrogène entre A et T nécessite moins d'énergie que la rupture des trois liaisons hydrogène entre G et C.
6. Pour le calcul du pourcentage de G + C, il suffit de remplacer  $T_m$  par la valeur obtenue de  $83,28^\circ\text{C}$  dans l'équation donnée dans l'énoncé. La résolution de cette équation donne : % G + C = 34,1 %.

### Exercice 5 Sonde d'ADN et hybridation moléculaire

1. A cause de la dégénérescence du code génétique, certains acides aminés sont codés par plusieurs codons. Les acides aminés concernés par le fragment P et codés par un seul codon sont Met (codon ATG) et Trp (codon TGG). Les acides aminés codés par 2 codons sont ici : Lys (codons AAA et AAG), Tyr (codons TAC et TAT) et Gln (codons CAA et CAG). Le nombre d'oligonucléotides possibles (on parle de sondes dégénérées) résulte de l'analyse combinatoire : 2 acides aminés avec 1 codon et 3 acides aminés avec deux codons, cela donne  $1 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 2 \cdot 2 = 8$  codons possibles dont les séquences sont données dans le tableau ci-dessous :

|         | Lys | Tyr | Met | Trp | Gln | Met |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Oligo 1 | AAA | TAC | ATG | TGG | CAA | ATG |
| Oligo 2 | AAG | TAC | ATG | TGG | CAA | ATG |
| Oligo 3 | AAA | TAT | ATG | TGG | CAA | ATG |
| Oligo 4 | AAG | TAT | ATG | TGG | CAA | ATG |
| Oligo 5 | AAA | TAC | ATG | TGG | CAG | ATG |
| Oligo 6 | AAG | TAC | ATG | TGG | CAG | ATG |
| Oligo 7 | AAA | TAT | ATG | TGG | CAG | ATG |
| Oligo 8 | AAG | TAT | ATG | TGG | CAG | ATG |

2. Phénomène de dénaturation-renaturation : le chauffage à  $90^\circ\text{C}$  provoque la dénaturation des fragments de l'ADN cible. Le refroidissement lent permet aux séquences complémentaires de s'hybrider. Les sondes oligonucléotidiques introduites en excès s'apparient aux brins de l'ADN cible pendant la phase de renaturation. Elles permettent ainsi d'effectuer la localisation souhaitée.

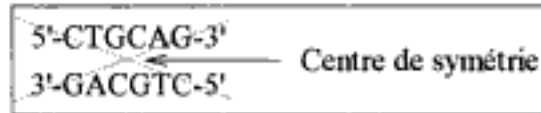
### Exercice 6 Analyse de l'ADN du bactériophage lambda

1. Structure probable de l'ADN étudié.  
On note que : A = T et C = G, il s'agit vraisemblablement d'un ADN double brin. D'autre part, aucune action des phosphodiesterases n'est notée, cet ADN ne dispose donc pas d'extrémités libres. Il s'agit d'un ADN double brin et circulaire.
2. La concentration de l'ADN extrait notée [ADN] est obtenue en utilisant l'équivalence absorbance  $\leftrightarrow$  concentration donnée par l'énoncé.
- $$[\text{ADN}] = 0,452 \cdot 50 \cdot (200 / 10) = 452 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$
3. Le rapport  $A_{260}/A_{280} = 0,452 / 0,383 = 1,2$ . Cette valeur inférieure à 1,8 (solution d'ADN pure), l'ADN est probablement contaminé par des protéines.
4. Il s'agit d'un ADN circulaire double brin, 5 sites pour *Eco* RI (G $\uparrow$ AATTC) vont générer 6 fragments alors que les 6 sites pour *Hind* III (A $\uparrow$ AGCCT) vont générer 7 fragments. Le nombre et la taille des fragments obtenus, suite à l'action de chacune des deux enzymes de restriction, figurent dans le tableau ci-dessous :

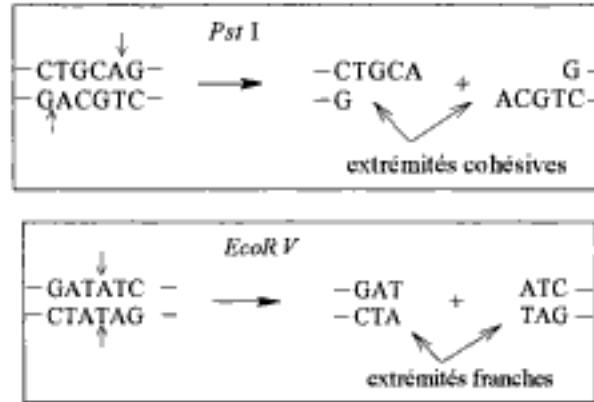
| <i>Eco</i> RI        |                 | <i>Hind</i> III      |                 |
|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| Fragment (début-fin) | Taille en bases | Fragment (début-fin) | Taille en bases |
| 1-21226              | 21226           | 1- 23130             | 23130           |
| 21227-26104          | 4878            | 23131- 25157         | 2027            |
| 26105-31747          | 5643            | 25158- 27479         | 2322            |
| 31748-39168          | 7421            | 27480- 36895         | 9416            |
| 39169-44972          | 5804            | 36896- 37459         | 564             |
| 44973-48502          | 3530            | 37460- 44141         | 6682            |
|                      |                 | 44142- 48502         | 4361            |

**Exercice 7** Etablissement de la carte de restriction d'un plasmide

1 Les enzymes de restriction sont des endonucléases reconnaissant des séquences spécifiques au niveau des molécules d'ADN. Les sites de reconnaissance sont des palindromes, c'est à dire des séquences à symétrie inversée.



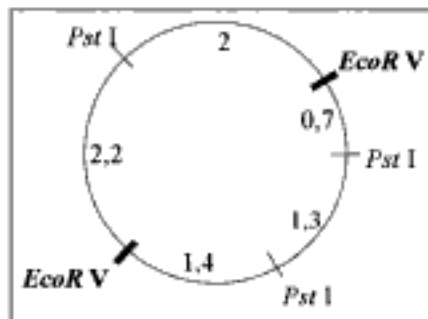
2. Schémas des réactions de coupure réalisées par les enzymes :



3. En supposant que la composition en bases et la répartition des 4 bases possibles soient aléatoires, la probabilité de rencontrer un site de coupure à 6 pb est de :  $1/4 \cdot 1/4 \cdot 1/4 \cdot 1/4 \cdot 1/4 \cdot 1/4 = (1/4)^6 = 1 / 4096$ .

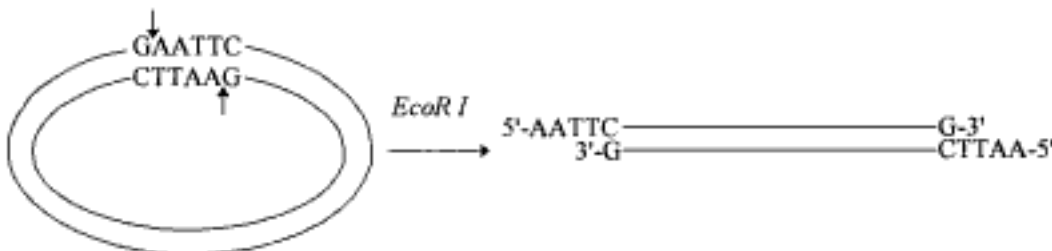
On peut donc prévoir qu'une telle enzyme va générer des fragments de 4096 pb. Cependant, la composition de l'ADN n'étant pas homogène, cela modifie considérablement les fréquences de coupure.

4. La carte de restriction du plasmide pour *EcoRV* et *Pst I* est la suivante :

**Exercice 8** Action d'enzymes sur le plasmide pBR322

1. Schématisation des réactions enzymatiques effectuées :

- traitement par *EcoRI* :



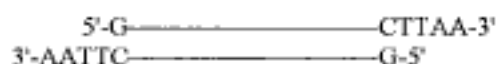
- incubation en présence de la polymérase I, d'ATP et d'TTP et ensuite en présence de la ligase T4 :

la polymérase I synthétise des oligonucléotides à partir des deux extrémités 3'-OH libres avec la partie simple brin comme matrice ; la ligase T4 suture l'ensemble, on obtient :



on note la disparition du site de restriction pour *EcoR* I

2. Après coupure par *EcoR* I le plasmide se présenterait comme suit :



La polymérase I ne pourrait pas agir faute de matrice et d'extrémités 3'-OH orientées convenablement. Le plasmide serait refermé par la ligase T4 et retrouverait sa structure d'origine.

### Exercice 9 Clonage d'un fragment d'ADN dans le plasmide pUC18

1 L'ajout de l'ampicilline dans le milieu permet de sélectionner les bactéries résistantes à l'ampicilline, c'est à dire ayant incorporé le plasmide pUC18 recombinant ou non.

2. Une colonie bleue indique que les bactéries comportent un vecteur pUC18 non recombinant. En effet l'intégration du plasmide natif permet de compléter la  $\beta$ -galactosidase déficiente et restituer l'activité de la  $\beta$ -galactosidase.

Une colonie blanche indique que les bactéries comportent un vecteur pUC18 recombinant. L'insertion de l'ADN étranger dans le polylinker interrompt le gène *lacZ'* et abolit la synthèse du peptide  $\alpha$ .

3. Il s'agit d'un contrôle qui permet de s'assurer que le plasmide permet de transformer les bactéries et qu'aucun ADN parasite ne s'insère dans le plasmide.

4. En fonction de l'enzyme de restriction utilisée, on a les résultats suivants :

| Enzyme utilisée | Type de colonies | Taille de l'ADN plasmidique en kpb | Taille de l'insert en kpb |
|-----------------|------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>EcoR</i> I   | A : bleue        | 2,69                               | 0                         |
|                 | B : blanche      | 3,00                               | $3,00 - 2,69 = 0,31$      |
|                 | C : blanche      | 3,28                               | $3,28 - 2,69 = 0,64$      |
| <i>Xba</i> I    | A : bleue        | 2,69                               | 0                         |
| <i>Bam</i> HI   | A : bleue        | 2,69                               | 0                         |
|                 | B : blanche      | 2,92                               | $2,92 - 2,69 = 0,23$      |
|                 | C : blanche      | 2,81                               | $2,81 - 2,69 = 0,12$      |
|                 | D : blanche      | 3,29                               | $3,29 - 2,69 = 0,60$      |

5. La taille du fragment d'ADN à cloner est égal à la somme de la taille des inserts obtenus avec l'une ou l'autre des enzymes de restriction, soit, par exemple pour *EcoR* I :  $0,31 + 0,64 = 0,95$  kpb = 950 paires de bases. Cette taille est confirmée par la somme des tailles des fragments obtenus par l'action de l'enzyme de restriction *Bam*HI.

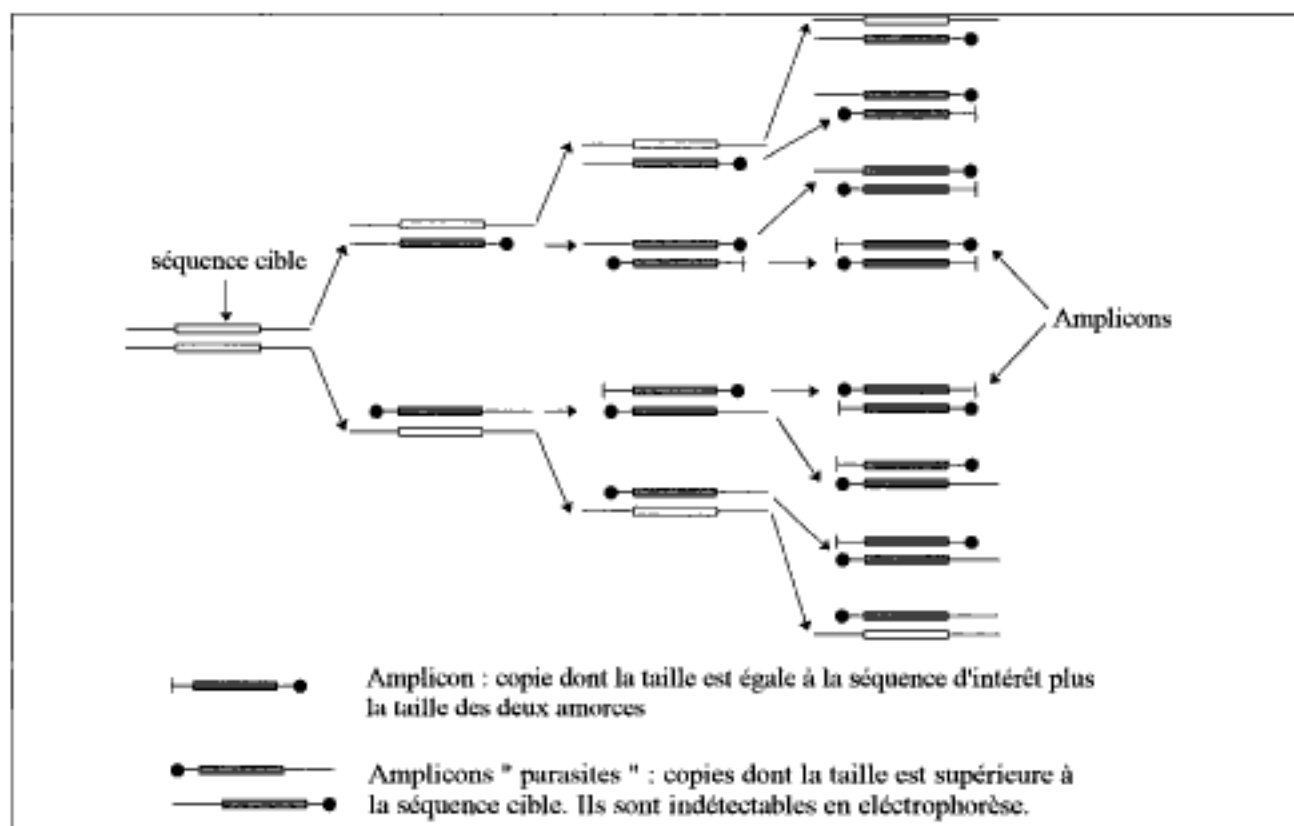
6. *Xba*I possède un site de restriction au niveau du polylinker. Le résultat expérimental obtenu montre qu'aucun site de restriction n'est présent sur le fragment d'ADN à cloner.

**Exercice 10** Modélisation du phénomène d'amplification par PCR

1. La progression géométrique de raison 2 permet d'établir la relation demandée, soit  $N = 2^n$ .
2. Calcul du nombre de copies cibles :

| Cycles             | 1 | 2 | 3 | 4  | 5  | 6  | ... | n : nombre de cycles                                    |
|--------------------|---|---|---|----|----|----|-----|---------------------------------------------------------|
| Copies totales (N) | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | ... | Progression géométrique de raison 2 soit :<br>$N = 2^n$ |
| Copies parasites   | 2 | 4 | 6 | 8  | 10 | 12 | ... | Progression arithmétique de raison 2 soit :<br>$2n$     |
| Copies cibles      | 0 | 0 | 2 | 8  | 22 | 52 | ... | $2^n - 2n$                                              |

On considère généralement le facteur " $2n$ " négligeable à la fin de la réaction devant " $2^n$ ".



3. Nombre de copies cibles après 25 cycles :  $2^{25} - 2.25 = 3,36.10^7$  copies. Le facteur d'amplification est d'environ  $10^7$  fois.

4. La relation tenant compte du nombre initial de copies est :  $N = N_0 \cdot (1+E)^n$  ou  $\ln N = \ln N_0 + n \cdot \ln(1+E)$  avec  $N = 2.10^8$ ,  $N_0 = 2.10^3$  et  $E = 0,88$ . L'application numérique conduit à trouver un nombre de cycles d'environ 18.

**Exercice 11** Choix des amorces pour PCR

Visualisation de la séquence à amplifier :

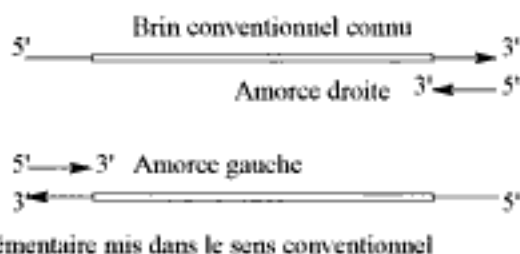
```

5' GAATCCCACG GTAAATTGGA ACACAAGGAT ATTCCAGTTC CAAAGCCAAA GGCCAACGAA 60
TTGTTGATCA ACGTTAAGTA CTCTGGTGTG TGTCAC ACCGACTTGCACGC TTGGCACGGT 120
GACTGGCCAT TGCCAGTTAA GCTACCATTA GTCGGTGGTC ACGAAGGTGC CGGTGTCTGTT 180
GTCGGCATGG GTGAAAACGT TAAGGGCTGG AAGATCGGTG ACTACGCCGG TATCAAATGG 240
TTGAACGGTT CTTGTATGGC CTGTGAATAC TGTGAATTGG GTAACGAA TCCAACTGTCTCT 300
CACGCTGACT TGTCTGGTTA CACCC 3' 325
  
```

La séquence amplifiée est indiquée en gras. Les zones de fixation des amorces sont en bleu.

1. La taille du segment amplifié sans les amorces est de :  $288 - 118 + 1 = 171$  bases. La taille du segment amplifié avec les amorces est de  $171 + (21 \cdot 2) = 213$  bases.

2. Si on souhaite l'amplification de ce segment allant de 118 à 288 compris, on doit encadrer ce segment avec une amorce droite (reverse) et une amorce gauche (forward), selon le schéma suivant :



L'amorce droite est complémentaire à la séquence du brin connu de 289 à 309 inclus (souligné sur le schéma en début de correction) :

- brin connu : 5'TCCAAGTGCCTCACGCTGAC3'
- séquence complémentaire : 3'AGGTTGACAGGAGTGCGACTG5'
- écriture conventionnelle : 5'GTCAGCGTGAGGACAGTTGGA3'

Le même type de raisonnement permet d'affirmer que l'amorce gauche est identique à la première séquence soulignée dans le schéma de début de correction, soit : 5'ACCGACTTGCACGCTTGGCAC3'.

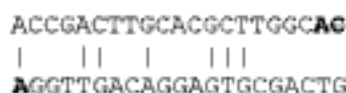
3. Critères de choix des amorces :

- taille : 17 à 30 nucléotides ;
- contenu GC : 50% et  $T_m$  proches ;
- absence de répétition d'un même nucléotide ;
- absence de complémentarité de séquences entre les amorces (formation de dimères d'amorces) ;
- faible risque de formation de structures secondaires.

4. Les  $T_m$  des deux amorces sont :

- amorce droite : 5'GTCAGCGTGAGGACAGTTGGA3'  $T_m = 66^\circ\text{C}$
- amorce gauche : 5'ACCGACTTGCACGCTTGGCAC3'  $T_m = 68^\circ\text{C}$

Les deux  $T_m$  sont proches. Les deux sondes sont compatibles. Mais ces deux sondes risquent de former des dimères comme suit :



Une solution consiste à raccourcir les deux amorces d'un (ici **A**) ou deux (ici **AG**) nucléotides afin d'atténuer la formation des dimères.

5. Les  $T_m$  des deux amorces déterminées par la méthode thermodynamique sont :

- amorce droite : 5'GTCAGCGTGAGGACAGTTGGA3'  $T_m = 59^\circ\text{C}$
- amorce gauche : 5'ACCGACTTGCACGCTTGGCAC3'  $T_m = 63^\circ\text{C}$

(Rappel : site utilisé : <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>)

On obtient des valeurs très différentes. Cela s'explique par la méthode de calcul utilisée. La règle de Wallace tient compte uniquement de la composition en bases (nombre de G et C). La méthode du plus proche voisin est plus satisfaisante car elle tient compte de la séquence et de l'ordre de l'enchaînement des bases responsables des forces d'empilement.

### Exercice 12 PCR et empreintes génétiques

1. Calcul de la fréquence des génotypes : pour le génotype 2 / 4 : on applique la loi de Hardy-Weinberg.

La fréquence de ce génotype hétérozygote est  $f = 2 \cdot 0,011 \cdot 0,032 = 0,000704$ . Cela signifie qu'on a 1 chance sur 1420 de retrouver ce génotype.

La fréquence du génotype homozygote 2 / 2 est  $f = 0,011 \cdot 0,011 = 0,000121$ . Cela signifie qu'on a 1 chance sur 8265 de retrouver ce génotype.

2. Le nombre de génotypes possibles est :  $(a^2 + a) / 2 = (28^2 + 28) / 2 = 406$ . Le nombre de génotypes hétérozygotes possibles est :  $406 - 28 = 378$ .

En effet, 28 allèles du même gène peuvent former 28 génotypes homozygotes (1/1, 2/2, 3/3, 4/4...)

3. La taille approximative des fragments amplifiés (en pb) est :  $16 \cdot n + 28 + 29$  (en incluant les amorces).

| Numéro d'allèle | Nombre de répétition | Taille approximative en pb | Fréquence |
|-----------------|----------------------|----------------------------|-----------|
| 1               | 18                   | 345                        | 0,293     |
| 2               | 19                   | 361                        | 0,011     |
| 3               | 20                   | 377                        | 0,021     |
| 4               | 21                   | 393                        | 0,032     |
| 5               | 22                   | 409                        | 0,043     |
| 6               | 23                   | 425                        | 0,016     |
| 7               | 24                   | 441                        | 0,335     |
| 8               | 25                   | 457                        | 0,037     |

#### 4. Commentaires sur les résultats de l'application électrophorétique.

4.1. Les traces biologiques telles que le sang, le sperme, les cheveux (avec les bulbes) sont présentes sur les lieux du crime en très faible quantité et partiellement dégradées. L'amplification par PCR permet d'augmenter significativement et spécifiquement la quantité d'ADN. Cependant des précautions doivent être prises pour éviter d'amplifier de l'ADN provenant de contaminants.

4.2. Le sperme est formé d'une population mixte de spermatozoïdes contenant chacun un lot de 23 chromosomes. L'ADN extrait d'un tel échantillon comporte tous les allèles de l'individu.

4.3. On peut exclure le suspect n°2 (génotype 4/7). Son profil ne coïncide pas avec celui de la trace T.

Quant au suspect n°1 (génotype 2/6), on ne peut pas conclure avec certitude quant à sa culpabilité. On peut calculer la probabilité P pour que la trace lui appartienne :  $P = 2 \cdot 0,011 \cdot 0,016 = 0,000352$

Il y'a une chance sur 2840 pour que deux individus pris au hasard dans la population américaine d'origine caucasienne aient le même profil. Cela ne constitue pas une preuve irréfutable de culpabilité.

4.4. Pour confondre le suspect, il convient d'explorer d'autres loci. Supposons qu'on explore 2 autres loci ayant la même fréquence pour un hétérozygote. La probabilité P de trouver un tel profil dans la population devient :

$P = 0,000352 \cdot 0,000352 \cdot 0,000352 = 4,36 \cdot 10^{-11}$ . Ce qui signifie qu'il y'a une chance sur 23.000.000.000 pour que deux individus aient le même profil. Ce qui est une preuve eu égard à la population mondiale.

4.5. Il n'est pas possible d'utiliser les mêmes fréquences alléliques. Le calcul des fréquences doit tenir compte de la distribution des allèles et leurs fréquences dans une population donnée.

4.6. Dans ce cas, les deux bandes supplémentaires proviennent soit :

- de la victime : ceci peut être vérifié grâce à la piste V ;
- d'un autre violeur.



## 9 - Bioinformatique

La bioinformatique est la discipline de l'analyse " in silico " de l'information biologique contenue dans les séquences nucléotidiques (séquences de nucléotides) et protéiques (séquences d'acides aminés). Son apparition, dans les années 1980, coïncide avec la création des premières banques de données (EMBL et GenBank). A partir des années 1990, la bioinformatique devient indispensable avec l'accumulation des données de séquençage de génomes complets. Fondée sur les acquis de la biologie, elle permet de produire de nouvelles connaissances et des suggestions pour de nouvelles expériences.

La bioinformatique propose des méthodes et des logiciels qui permettent :

- le recueil, le stockage et la gestion des données biologiques et leur distribution à travers les réseaux ;
- le développement des outils pour analyser les problèmes de biologie moléculaire ;
- l'analyse, la comparaison et la prédiction de la structure des gènes ;
- la modélisation et la prédiction de la structure et de la fonction des protéines ;
- les études phylogénétiques et l'évolution moléculaire des êtres vivants.

### 1. Banques de données biologiques

Bases de données contenant des informations biologiques et des données de séquences largement diffusées par le réseau Internet. Elle sont généralement reliées entre elles par des liens, " links " ou des " cross-references ".

| Nom                                                  | Commentaires                                                                                                                | Adresse Internet (cf. cédérom)                                                        |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Portails</b>                                      |                                                                                                                             |                                                                                       |
| NCBI (National Center for Biotechnology Information) | Portail américain de bioinformatique. Points forts : banques de séquences nucléotidiques, BLAST, banques génomiques, PubMed | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>                 |
| EBI (European Bioinformatics Institute)              | Portail européen de bioinformatique. Points forts : banques de séquences nucléotidiques et protéiques, FASTA, ChustaW       | <a href="http://www.ebi.ac.uk">http://www.ebi.ac.uk</a>                               |
| KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)       | Portail japonais de bioinformatique. Points forts : voies métaboliques, banque de biomolécules                              | <a href="http://www.genome.ad.jp/kegg">http://www.genome.ad.jp/kegg</a>               |
| EXPASY (Expert Protein Analysis System)              | Portail de l'institut Suisse de bioinformatique. Points forts : protéines, enzymes, structures 3D                           | <a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>                               |
| Infobiogen                                           | Portail français de bioinformatique. Points forts : annuaire des outils, documentation                                      | <a href="http://www.infobiogen.fr">http://www.infobiogen.fr</a>                       |
| Bioweb Pasteur                                       | Portail de bioinformatique de l'Institut Pasteur. Points forts : logiciels de bioinformatique en ligne                      | <a href="http://bioweb.pasteur.fr">http://bioweb.pasteur.fr</a>                       |
| <b>Acides nucléiques</b>                             |                                                                                                                             |                                                                                       |
| Genbank                                              |                                                                                                                             | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez</a>   |
| EMBL (European Molecular Biology Library)            | Banques de séquences nucléotidiques dotées de systèmes d'interrogation. Elles échangent régulièrement leurs informations    | <a href="http://srs.ebi.ac.uk">http://srs.ebi.ac.uk</a>                               |
| DDBJ (DNA Data Bank of Japan)                        |                                                                                                                             | <a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp">http://www.ddbj.nig.ac.jp</a>                     |
| <b>Protéines</b>                                     |                                                                                                                             |                                                                                       |
| Swiss-prot                                           | Séquences bien annotées et faiblement redondantes                                                                           | <a href="http://ca.expasy.org/sprot">http://ca.expasy.org/sprot</a>                   |
| PIR (Protein Information Resource)                   | Séquences et outils d'analyses                                                                                              | <a href="http://pir.georgetown.edu">http://pir.georgetown.edu</a>                     |
| TrEMBL                                               | Séquences déduites à partir des séquences codantes des banques nucléotidiques EMBL/GenBank/DDBJ                             | <a href="http://www.ebi.ac.uk/trembl">http://www.ebi.ac.uk/trembl</a>                 |
| Uniprot                                              | Consortium regroupant Swiss-Prot-TrEMBL-PIR                                                                                 | <a href="http://www.ebi.uniprot.org">http://www.ebi.uniprot.org</a>                   |
| PDB (Protein Data Bank)                              | Structure 3D des protéines au format PDB                                                                                    | <a href="http://www.rcsb.org">http://www.rcsb.org</a>                                 |
| <b>Banque de données spécialisées</b>                |                                                                                                                             |                                                                                       |
| Mapviewer                                            | Génomes complets, localisation des gènes                                                                                    | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview</a> |
| OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)           | Informations sur les maladies génétiques chez l'homme                                                                       | <a href="http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim">http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim</a>     |
| Orphanet                                             | Base de données sur les maladies rares                                                                                      | <a href="http://orpha.net">http://orpha.net</a>                                       |
| VectorDB                                             | Base de données des vecteurs utilisés en biologie                                                                           | <a href="http://seq.yeastgenome.org/vectordb">http://seq.yeastgenome.org/vectordb</a> |
| <b>Bibliographie</b>                                 |                                                                                                                             |                                                                                       |
| PubMed - Medline                                     | Articles, publications en biologie et en médecine                                                                           | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>                 |
| Connectsciences                                      | Service du CNRS. Articles, thèses, ...                                                                                      | <a href="http://connectsciences.inist.fr">http://connectsciences.inist.fr</a>         |
| Google Scholar                                       | Publications scientifiques avec Google                                                                                      | <a href="http://scholar.google.com">http://scholar.google.com</a>                     |

## 2. Outils de la bioinformatique

Le traitement bioinformatique des séquences biologiques peut être :

- simple : composition, calcul de  $T_m$ , traduction, carte de restriction, recherche de cadres ouverts de lecture ;
- complexe : alignements, recherche d'amorces et optimisation des amorces, prédiction de structures secondaires et tertiaires, recherche de motifs, construction d'arbres phylogénétiques. Cette dernière catégorie nécessite une connaissance minimale des outils utilisés.

| Outil                                     | Commentaires                                                                   | Adresse Internet (cf. cédérom)                                                                                                                    |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Séquences nucléotidiques</b>           |                                                                                |                                                                                                                                                   |
| Readseq                                   | Conversion des formats de séquences (Fasta, Embl, ...)                         | <a href="http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/readseq.cgi">http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/readseq.cgi</a>                                                   |
| Freqseq                                   | Détermination de la composition en bases                                       | <a href="http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/freqsq_in.pl">http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/freqsq_in.pl</a>     |
| Carteres                                  | Etablissement de la carte de restriction d'une séquence avec choix des enzymes | <a href="http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/carteres_in.pl">http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/carteres_in.pl</a> |
| TACG                                      |                                                                                | <a href="http://biotools.umassmed.edu/tacg">http://biotools.umassmed.edu/tacg</a>                                                                 |
| ORFfinder                                 | Recherche des ORF ("Open Reading Frame")                                       | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf</a>                                                                   |
| Transeq                                   | Traduction dans les 6 phases de lecture                                        | <a href="http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq">http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq</a>                                                             |
| Traduc                                    |                                                                                | <a href="http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl">http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl</a>     |
| VecScreen                                 | Détection de fragments de vecteurs de clonage                                  | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen</a>                                                         |
| GenMark                                   | Prédiction de gènes eucaryotes et procaryotes                                  | <a href="http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark">http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark</a>                                                     |
| Outils pour ARN                           | Outils de prédiction de structures des ARN                                     | <a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/rna/">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/rna/</a>                                                         |
| <b>Outils pour la PCR</b>                 |                                                                                |                                                                                                                                                   |
| OligoCalc                                 | Détermination de $T_m$ par différentes méthodes                                | <a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>                 |
| $T_m$ -pred                               |                                                                                | <a href="http://dna.bio.puc.cl/cardex/servers/dnaMATE">http://dna.bio.puc.cl/cardex/servers/dnaMATE</a>                                           |
| Primer3                                   | Recherche d'amorces pour PCR                                                   | <a href="http://biotools.umassmed.edu">http://biotools.umassmed.edu</a>                                                                           |
| Primerquest                               |                                                                                | <a href="http://biotools.idtdna.com/primerquest">http://biotools.idtdna.com/primerquest</a>                                                       |
| FastPCR (téléchargeable)                  |                                                                                | <a href="http://biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm">http://biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm</a>                           |
| <b>Séquences d'acides aminés</b>          |                                                                                |                                                                                                                                                   |
| ProtParam                                 | Détermination paramètres physicochimiques (masse moléculaire, pHi, ...)        | <a href="http://www.expasy.org/tools/protparam.html">http://www.expasy.org/tools/protparam.html</a>                                               |
| Psipred                                   | Prédiction des hélices alpha, feuillets bêta                                   | <a href="http://www.expasy.org/tools/#secondary">http://www.expasy.org/tools/#secondary</a>                                                       |
| SignalP                                   | Recherche de peptide signal                                                    | <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP</a>                                                       |
| TMpred                                    | Prédiction de fragments transmembranaires                                      | <a href="http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>                                       |
| Prosite                                   | Banques de motifs                                                              | <a href="http://www.expasy.ch/prosite">http://www.expasy.ch/prosite</a>                                                                           |
| SWISS-MODEL                               | Modélisation 3D                                                                | <a href="http://swissmodel.expasy.org">http://swissmodel.expasy.org</a>                                                                           |
| <b>Alignement de séquences</b>            |                                                                                |                                                                                                                                                   |
| Needle                                    | Alignement global (algorithme de Needleman)                                    | <a href="http://www.ebi.ac.uk/emboss/align">http://www.ebi.ac.uk/emboss/align</a>                                                                 |
| FASTA(FAST-All)                           | Alignement local                                                               | <a href="http://www2.ebi.ac.uk/fasta3">http://www2.ebi.ac.uk/fasta3</a>                                                                           |
| BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) | Alignement local                                                               | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>                                                                 |
| Weblogo                                   | Création de séquences logo d'un alignement multiple                            | <a href="http://weblogo.cbr.nrc.ca">http://weblogo.cbr.nrc.ca</a>                                                                                 |
| T-Coffee                                  | Alignement multiple                                                            | <a href="http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi">http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi</a>             |
| Multalin                                  |                                                                                | <a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_multalin.pl">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_multalin.pl</a>                               |
| ClustalW                                  | Alignement multiple et analyse phylogénétique                                  | <a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw">http://www.ebi.ac.uk/clustalw</a>                                                                         |
| Phylip                                    |                                                                                | <a href="http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/phylo_in.pl">http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/phylo_in.pl</a>       |

### 3. Principes de base de l'alignement de séquences

La diversité génétique est due à des mutations ponctuelles et à des insertions / délétions apparues au cours de l'évolution. Comparer des séquences par alignement permet de déterminer leur degré de similarité et d'émettre une hypothèse quant à leur parenté évolutive (homologie). Il faut bien distinguer les termes identité, similitude et homologie :

- identité : estimation de la fraction de résidus identiques entre deux séquences (fondée sur un alignement) ;
- similitude : estimation de la fraction de résidus similaires entre deux séquences. Deux résidus sont considérés comme similaires lorsque leur score de substitution est supérieur à 0. La mesure de similarité dépend d'un alignement et d'une matrice de substitution ;
- homologie : désigne une parenté évolutive entre deux séquences, c'est à dire dérivant d'un ancêtre commun.

#### 3.1. Alignement et détermination du score

Aligner deux séquences, c'est rechercher le maximum d'appariements entre les lettres qui les composent (nucléotides ou résidus d'acides aminés) avec le minimum de mésappariements et de brèches (voir schéma). Les pénalités des brèches doivent être suffisamment coûteuses pour éviter les alignements sans signification biologique. Le coût d'extension d'une brèche déjà ouverte est généralement plus faible par rapport à celui de son ouverture.

La recherche de similitude entre séquences nécessite la détermination d'un score de similarité.

$$\text{Score} = \sum \text{scores élémentaires} - \sum \text{pénalités}$$

Exemple de détermination de score avec la matrice unitaire (l'appariement vaut +1, le mésappariement vaut 0 et une brèche vaut -1) :

| Alignement sans brèches                                                         | Alignement avec brèches                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Séquence 1 : ATGACTGGGCCACT<br>  ...  . .                                       | ATGACTGGGCC-ACT<br>      )  .                                         |
| Séquence 2 : ATACTGGGACAAC                                                      | AT-ACTGGGACAAC                                                        |
| 8 appariements ("match") et 6 mésappariements ("mismatch")<br>score : 8 - 0 = 8 | 12 appariements, 1 mésappariement et 2 brèches<br>score : 12 - 2 = 10 |

#### 3.2. Matrices de score

| Matrices nucléiques                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Matrices protéiques (BLOSUM62) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---|----|----|----|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|---|---|----|----|---|-------|----|---|---|----|----|---|---|----|---|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----|---|---|---|----|---|---|---|---|----|----|---|----|----|----|---|---|----|----|----|-------|----|----|---|---|----|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----|---|---|---|----|---|---|----|---|----|----|---|---|----|----|---|----|----|----|----|-------|----|---|---|---|----|---|---|----|---|----|----|---|----|----|----|---|----|----|----|----|-------|---|----|---|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|-------|----|---|---|----|----|---|---|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|----|---|---|----|----|----|----|----|---|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|----|---|---|----|----|----|----|----|---|-------|----|---|---|----|----|---|---|----|----|----|----|---|----|----|----|---|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|---|----|----|----|---|---|----|---|---|----|----|----|----|----|---|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|----|---|---|----|----|----|---|---|----|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|-------|---|----|---|---|----|---|---|---|----|----|----|---|----|----|----|---|---|----|----|----|-------|---|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|----|----|---|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|---|----|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|---|----|----|----|---|---|----|-------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|----|---|----|----|----|---|----|----|---|
| <table border="1"> <tr><td></td><td>A</td><td>C</td><td>G</td><td>T</td></tr> <tr><td>A</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>C</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>G</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>T</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td></tr> </table> <p>Matrice unitaire</p> <table border="1"> <tr><td></td><td>A</td><td>C</td><td>G</td><td>T</td></tr> <tr><td>A</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>C</td><td>0</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>G</td><td>1</td><td>0</td><td>3</td><td>0</td></tr> <tr><td>T</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>3</td></tr> </table> <p>Matrice à 3 scores</p> |                                | A  | C  | G  | T  | A  | 1  | 0  | 0  | 0  | C  | 0  | 1  | 0  | 0  | G  | 0  | 0  | 1  | 0  | T | 0 | 0 | 0 | 1 |  | A | C | G | T | A | 3 | 0 | 1 | 0 | C | 0 | 3 | 0 | 1 | G | 1 | 0 | 3 | 0 | T | 0 | 1 | 0 | 3 | <table border="1"> <tr><td>Ala A</td><td>4</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>0</td><td>-1</td><td>-1</td><td>0</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>1</td><td>0</td><td>-3</td><td>-2</td><td>0</td></tr> <tr><td>Arg R</td><td>-1</td><td>6</td><td>0</td><td>-2</td><td>-3</td><td>1</td><td>0</td><td>-2</td><td>0</td><td>-3</td><td>-2</td><td>2</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-3</td></tr> <tr><td>Asn N</td><td>-2</td><td>0</td><td>6</td><td>1</td><td>-3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>-3</td><td>-3</td><td>0</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-2</td><td>1</td><td>0</td><td>-4</td><td>-2</td><td>-3</td></tr> <tr><td>Asp D</td><td>-2</td><td>-2</td><td>1</td><td>6</td><td>-3</td><td>0</td><td>2</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-4</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>0</td><td>-1</td><td>-4</td><td>-3</td><td>-3</td></tr> <tr><td>Cys C</td><td>0</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-3</td><td>9</td><td>-3</td><td>-4</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-1</td></tr> <tr><td>Gln Q</td><td>-1</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>-3</td><td>6</td><td>2</td><td>-2</td><td>0</td><td>-3</td><td>-2</td><td>1</td><td>0</td><td>-3</td><td>-1</td><td>0</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-2</td></tr> <tr><td>Glu E</td><td>-1</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>-4</td><td>2</td><td>6</td><td>-2</td><td>0</td><td>-3</td><td>-3</td><td>1</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-1</td><td>0</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-2</td></tr> <tr><td>Gly G</td><td>0</td><td>-2</td><td>0</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-2</td><td>6</td><td>-2</td><td>-4</td><td>-4</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-2</td><td>0</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-3</td></tr> <tr><td>His H</td><td>-2</td><td>0</td><td>1</td><td>-1</td><td>-3</td><td>0</td><td>0</td><td>-2</td><td>8</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>2</td><td>-3</td></tr> <tr><td>Ile I</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-4</td><td>-3</td><td>4</td><td>2</td><td>-3</td><td>1</td><td>0</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-1</td><td>3</td></tr> <tr><td>Leu L</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-4</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-4</td><td>-3</td><td>2</td><td>4</td><td>-2</td><td>2</td><td>0</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>1</td></tr> <tr><td>Lys K</td><td>-1</td><td>2</td><td>0</td><td>-1</td><td>-3</td><td>1</td><td>1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>6</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-1</td><td>0</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-2</td></tr> <tr><td>Met M</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-1</td><td>0</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-2</td><td>1</td><td>2</td><td>-1</td><td>6</td><td>0</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>1</td></tr> <tr><td>Phe F</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>0</td><td>0</td><td>-3</td><td>0</td><td>6</td><td>-4</td><td>-2</td><td>-2</td><td>1</td><td>3</td><td>-1</td></tr> <tr><td>Pro P</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-4</td><td>7</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-4</td><td>-3</td><td>-2</td></tr> <tr><td>Ser S</td><td>1</td><td>-1</td><td>1</td><td>0</td><td>-1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>0</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>4</td><td>1</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-2</td></tr> <tr><td>Thr T</td><td>0</td><td>-1</td><td>0</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>1</td><td>6</td><td>-2</td><td>-2</td><td>0</td></tr> <tr><td>Trp W</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-4</td><td>-4</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-1</td><td>1</td><td>-4</td><td>-3</td><td>-2</td><td>11</td><td>2</td><td>-3</td></tr> <tr><td>Tyr Y</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-3</td><td>2</td><td>-1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-1</td><td>3</td><td>-3</td><td>-2</td><td>-2</td><td>2</td><td>7</td><td>-1</td></tr> <tr><td>Val V</td><td>0</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-3</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>-3</td><td>-3</td><td>3</td><td>1</td><td>-2</td><td>1</td><td>-1</td><td>-2</td><td>-2</td><td>0</td><td>-3</td><td>-1</td><td>4</td></tr> </table> <p>A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V</p> | Ala A | 4 | -1 | -2 | -2 | 0 | -1 | -1 | 0 | -2 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1 | 0 | -3 | -2 | 0 | Arg R | -1 | 6 | 0 | -2 | -3 | 1 | 0 | -2 | 0 | -3 | -2 | 2 | -1 | -3 | -2 | -1 | -1 | -3 | -2 | -3 | Asn N | -2 | 0 | 6 | 1 | -3 | 0 | 0 | 0 | 1 | -3 | -3 | 0 | -2 | -3 | -2 | 1 | 0 | -4 | -2 | -3 | Asp D | -2 | -2 | 1 | 6 | -3 | 0 | 2 | -1 | -1 | -3 | -4 | -1 | -3 | -3 | -1 | 0 | -1 | -4 | -3 | -3 | Cys C | 0 | -3 | -3 | -3 | 9 | -3 | -4 | -3 | -3 | -1 | -1 | -3 | -1 | -2 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | Gln Q | -1 | 1 | 0 | 0 | -3 | 6 | 2 | -2 | 0 | -3 | -2 | 1 | 0 | -3 | -1 | 0 | -1 | -2 | -1 | -2 | Glu E | -1 | 0 | 0 | 2 | -4 | 2 | 6 | -2 | 0 | -3 | -3 | 1 | -2 | -3 | -1 | 0 | -1 | -3 | -2 | -2 | Gly G | 0 | -2 | 0 | -1 | -3 | -2 | -2 | 6 | -2 | -4 | -4 | -2 | -3 | -3 | -2 | 0 | -2 | -2 | -3 | -3 | His H | -2 | 0 | 1 | -1 | -3 | 0 | 0 | -2 | 8 | -3 | -3 | -1 | -2 | -1 | -2 | -1 | -2 | -2 | 2 | -3 | Ile I | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | 4 | 2 | -3 | 1 | 0 | -3 | -2 | -1 | -3 | -1 | 3 | Leu L | -1 | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | 2 | 4 | -2 | 2 | 0 | -3 | -2 | -1 | -2 | -1 | 1 | Lys K | -1 | 2 | 0 | -1 | -3 | 1 | 1 | -2 | -1 | -3 | -2 | 6 | -1 | -3 | -1 | 0 | -1 | -3 | -2 | -2 | Met M | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | 0 | -2 | -3 | -2 | 1 | 2 | -1 | 6 | 0 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | Phe F | -2 | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0 | 0 | -3 | 0 | 6 | -4 | -2 | -2 | 1 | 3 | -1 | Pro P | -1 | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | 7 | -1 | -1 | -4 | -3 | -2 | Ser S | 1 | -1 | 1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | -1 | -2 | -2 | 0 | -1 | -2 | -1 | 4 | 1 | -3 | -2 | -2 | Thr T | 0 | -1 | 0 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1 | 6 | -2 | -2 | 0 | Trp W | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | 1 | -4 | -3 | -2 | 11 | 2 | -3 | Tyr Y | -2 | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | 2 | -1 | -1 | -2 | -1 | 3 | -3 | -2 | -2 | 2 | 7 | -1 | Val V | 0 | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | 3 | 1 | -2 | 1 | -1 | -2 | -2 | 0 | -3 | -1 | 4 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | A                              | C  | G  | T  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1                              | 0  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0                              | 1  | 0  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| G                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0                              | 0  | 1  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0                              | 0  | 0  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | A                              | C  | G  | T  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 3                              | 0  | 1  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0                              | 3  | 0  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| G                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1                              | 0  | 3  | 0  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 0                              | 1  | 0  | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Ala A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 4                              | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -1 | 0  | -2 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1  | 0  | -3 | -2 | 0  |    |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Arg R                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | 6  | 0  | -2 | -3 | 1  | 0  | -2 | 0  | -3 | -2 | 2  | -1 | -3 | -2 | -1 | -1 | -3 | -2 | -3 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Asn N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -2                             | 0  | 6  | 1  | -3 | 0  | 0  | 0  | 1  | -3 | -3 | 0  | -2 | -3 | -2 | 1  | 0  | -4 | -2 | -3 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Asp D                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -2                             | -2 | 1  | 6  | -3 | 0  | 2  | -1 | -1 | -3 | -4 | -1 | -3 | -3 | -1 | 0  | -1 | -4 | -3 | -3 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Cys C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0                              | -3 | -3 | -3 | 9  | -3 | -4 | -3 | -3 | -1 | -1 | -3 | -1 | -2 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Gln Q                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | 1  | 0  | 0  | -3 | 6  | 2  | -2 | 0  | -3 | -2 | 1  | 0  | -3 | -1 | 0  | -1 | -2 | -1 | -2 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Glu E                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | 0  | 0  | 2  | -4 | 2  | 6  | -2 | 0  | -3 | -3 | 1  | -2 | -3 | -1 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Gly G                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0                              | -2 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 | 6  | -2 | -4 | -4 | -2 | -3 | -3 | -2 | 0  | -2 | -2 | -3 | -3 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| His H                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -2                             | 0  | 1  | -1 | -3 | 0  | 0  | -2 | 8  | -3 | -3 | -1 | -2 | -1 | -2 | -1 | -2 | -2 | 2  | -3 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Ile I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | 4  | 2  | -3 | 1  | 0  | -3 | -2 | -1 | -3 | -1 | 3  |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Leu L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | 2  | 4  | -2 | 2  | 0  | -3 | -2 | -1 | -2 | -1 | 1  |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Lys K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | 2  | 0  | -1 | -3 | 1  | 1  | -2 | -1 | -3 | -2 | 6  | -1 | -3 | -1 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Met M                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | -1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -2 | -3 | -2 | 1  | 2  | -1 | 6  | 0  | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Phe F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -2                             | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0  | 0  | -3 | 0  | 6  | -4 | -2 | -2 | 1  | 3  | -1 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Pro P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -1                             | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | 7  | -1 | -1 | -4 | -3 | -2 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Ser S                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1                              | -1 | 1  | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -2 | -1 | 4  | 1  | -3 | -2 | -2 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Thr T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0                              | -1 | 0  | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1  | 6  | -2 | -2 | 0  |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Trp W                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -3                             | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | 1  | -4 | -3 | -2 | 11 | 2  | -3 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Tyr Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | -2                             | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | 2  | -1 | -1 | -2 | -1 | 3  | -3 | -2 | -2 | 2  | 7  | -1 |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |
| Val V                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0                              | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | 3  | 1  | -2 | 1  | -1 | -2 | -2 | 0  | -3 | -1 | 4  |   |   |   |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |   |    |    |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |   |   |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |   |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |   |    |   |   |    |   |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |   |   |    |    |   |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |   |   |    |    |   |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |   |    |    |    |   |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |       |   |    |   |   |    |   |   |   |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |    |    |       |   |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |    |   |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |   |    |    |    |   |   |    |       |   |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |    |   |    |    |    |   |    |    |   |

La matrice à 3 scores distingue :

- les **transitions** (A ↔ G et C ↔ T)
- les **transversions** (modification d'une base purique par une base pyrimidique et inversement).

Les matrices BLOSUM ("BLOcks SUBstitution Matrix") sont déduites d'alignements de fragments (Blocks) de protéines très éloignées. BLOSUM62 est déduite à partir d'un alignement de séquences ayant 62 % de similitude. Ces matrices sont bien adaptées aux recherches de séquences dans les banques de données (BLAST, FASTA).

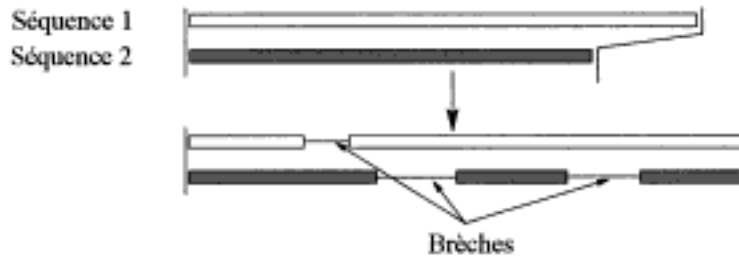
Chaque score donne le coût de remplacement d'un résidu par un autre. On note que :

- les acides aminés rares ont des scores élevés (Trp, Cys, His) ;
- les acides aminés communs ont des scores faibles (Ala, Leu, Ile, ...)
- les substitutions conservatives, entre acides aminés similaires sont peu pénalisantes. Ces substitutions peuvent se produire sans affecter l'activité de la protéine (ex : Lys ↔ Arg).

Autre matrice : PAM ("Point Accepted Mutation") déduites d'alignements globaux de familles de protéines très proches (cytochromes, hémoglobines, ...).

#### 4. Alignement global

Alignement de 2 séquences sur la totalité de leur longueur en tenant compte de tous les résidus. Si les longueurs des séquences sont différentes, des insertions / délétions sont introduites pour aligner les deux extrémités des 2 séquences. Il permet de mesurer le degré de similitude entre 2 séquences connues.



##### 4.1. Dot-plot

**Principe** : outil visuel de comparaison de séquences. Les séquences sont positionnées perpendiculairement dans un tableau et on met un point à chaque appariement. La multiplicité des points forme des diagonales. Les décalages correspondent des insertions / délétions et les segments parallèles indiquent des répétitions. Si on reprend l'exemple précédent cela donne le tableau suivant :

|   | A | T | G | A | C | T | G | G | C | C | A | C | T |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | o |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |   |   |
| T |   | o |   |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |
| A | o |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |   |   |
| C |   |   |   |   |   |   |   |   | o | o |   |   |   |
| T |   | o |   |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |
| G |   |   | o |   |   |   | o | o |   |   |   |   |   |
| G |   |   | o |   |   |   | o | o |   |   |   |   |   |
| G |   |   | o |   |   |   | o | o |   |   |   |   |   |
| A | o |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |   |   |
| C |   |   |   |   |   |   |   |   | o | o |   |   |   |
| A | o |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |   |   |
| A | o |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |   |   |
| C |   |   |   |   |   |   |   |   | o | o |   |   |   |
| T |   | o |   |   |   | o |   |   |   |   |   |   | o |

L'examen de la diagonale permet de trouver l'alignement optimal de l'exemple précédent en suivant le tracé bleu.

**Avantages et inconvénients** : simple et intuitif. Mais des problèmes de bruit de fond se posent pour les longues séquences. Cela nécessite l'utilisation d'un filtrage : on ne met un point que si  $n$  caractères sont identiques dans une fenêtre donnée, pour éliminer les segments de similitudes courtes.

##### 4.2. Needle (algorithme de Needleman et Wunsch, 1970)

**Principe** : Needle permet de déterminer le meilleur alignement évalué par un score. Pour cela il construit le chemin optimal allant du coin supérieur gauche au coin inférieur droit d'un tableau à deux dimensions. Chaque case contient le score cumulé à partir du coin supérieur gauche de la matrice à cette case. L'alignement optimal est obtenu en remontant à travers la matrice de la position finale à la position initiale.

**Avantages et inconvénients** : permet d'évaluer le degré de similarité entre deux séquences connues. Utile pour mettre en évidence les introns dans un gène. Il ne permet pas de révéler la présence de courts segments très similaires, car pénalisés par les autres parties.

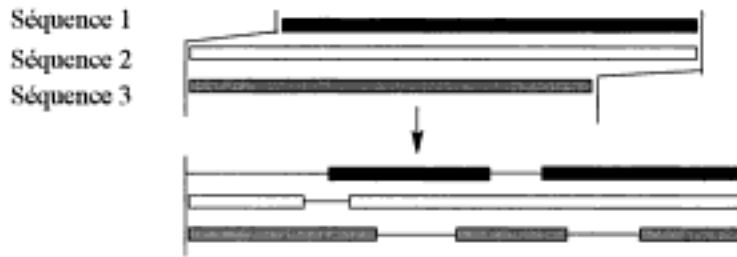
##### 4.3. Stretcher

Stretcher détermine le meilleur alignement global entre séquences à l'aide de l'algorithme de Myers et Miller. Il donne les mêmes résultats que Needle, mais les alignements sont calculés en espace linéaire (et non quadratique comme dans le cas de Needle). Cet algorithme est donc idéal pour l'alignement de très longues séquences (>10000 éléments).

Hidden page

## 6. L'alignement multiple

**Principe :** alignement portant sur plusieurs séquences à la fois et dans leur intégralité. Il permet de mettre en évidence les relations entre séquences que l'on ne peut pas visualiser en comparant les séquences 2 à 2.

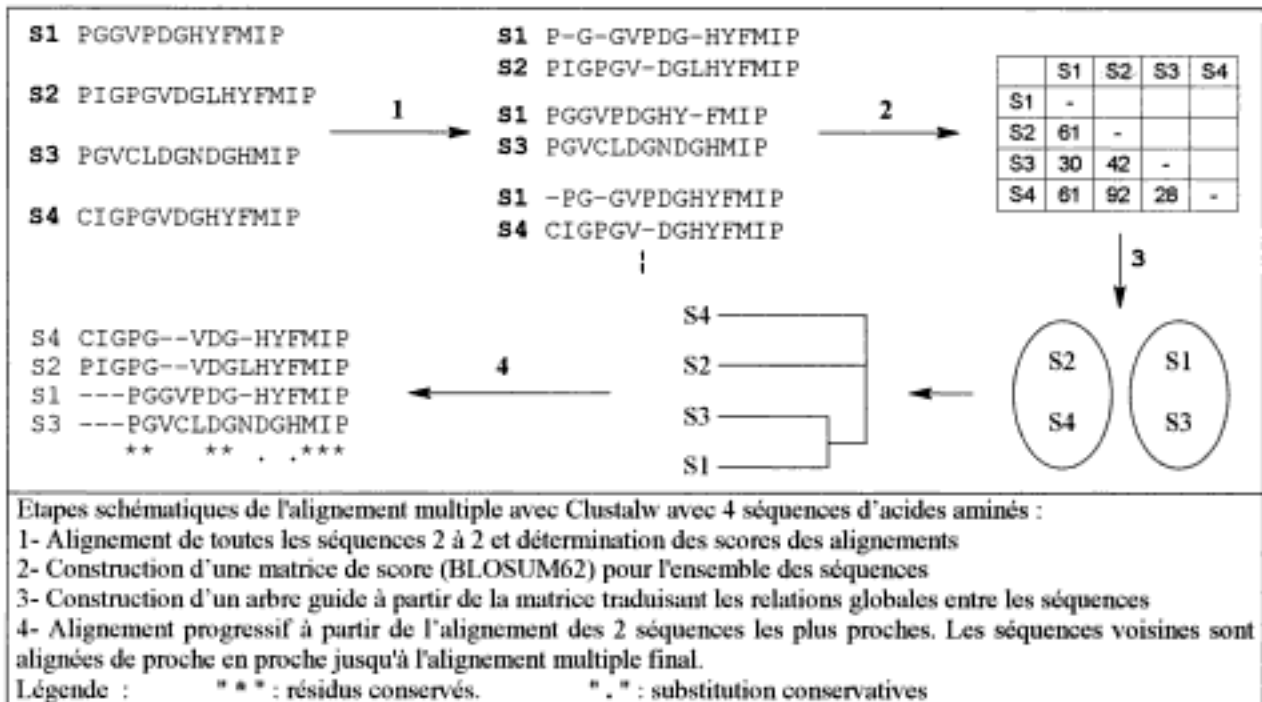


### Applications :

- caractérisation de régions conservées des protéines (motifs et domaines conservés) ;
- prédiction des structures 2D ou 3D par comparaison avec des structures connues ;
- construction des arbres phylogénétiques des séquences homologues.

### 6.1. CLUSTALW (" Cluster Alignment ". Thompson , Higgins & Gibson, 1995)

**Principe :** CLUSTALW est fondé sur l'utilisation d'un algorithme d'alignement progressif. Les séquences les plus similaires sont alignées en premier puis l'alignement progresse vers les séquences les plus distantes. C'est également un programme de construction d'arbres phylogénétiques.



**Interprétation des résultats :** Les résultats de Clustalw comportent plusieurs rubriques :

- une table de score des alignements de séquences 2 à 2 (étape 2) ;
- l'alignement multiple avec une indication sur les identités et substitutions (étape 4) ;
- un arbre guide (cladogramme) qui a servi à la construction de l'alignement. Il exprime les relations entre les séquences dont la longueur des branches est égale. A distinguer du phylogramme dont la longueur des branches est proportionnelle au nombre de changements évolutifs (mutations) ;
- un calcul des distances entre séquences, déterminé par le nombre de mésappariements divisé par le nombre d'appariements sans tenir compte des brèches.

### 6.2. T-COFFEE (Notredame, Higgins, Hering, 2000)

T-COFFEE est fondé également sur un alignement progressif. En plus de réaliser un alignement global entre chacune des paires de séquences, il procède à un alignement local afin d'optimiser l'alignement entre les séquences très divergentes.

### 6.3. Séquences logo

Représentation graphique de séquences alignées. La hauteur des caractères est proportionnelle à leur fréquence dans les séquences.

## 7. Phylogénétique moléculaire

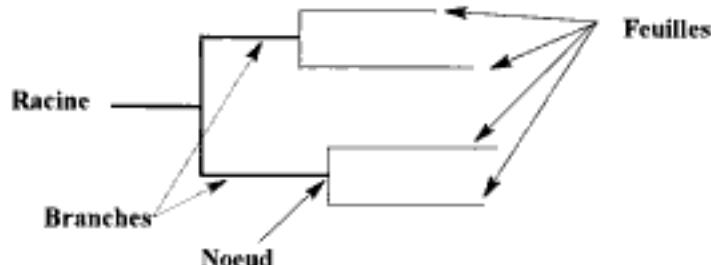
L'évolution moléculaire est une extension de la théorie darwinienne de l'évolution. La pression sélective s'exerce par le biais de modifications graduelles au cours du temps. La phylogénie moléculaire renseigne sur ces changements survenus au niveau des séquences au cours de l'évolution. Elle tente d'établir des filiations et des liens de parenté entre espèces différentes à partir de l'analyse de séquences.

Elle permet notamment de distinguer les séquences :

- orthologues : séquences homologues de même origine et provenant d'espèces différentes ;
- paralogues : séquences homologues d'un même organisme, ayant divergé par duplication d'un même gène ancestral.

### 7.1. Les arbres phylogénétiques

Les relations entre les organismes sont représentées par des arbres :



- les feuilles représentent les taxons ou les espèces moléculaires ;
- les noeuds symbolisent des ancêtres hypothétiques ;
- la longueur des branches est proportionnelle aux distances évolutives (nombre de mutations ou temps d'évolution).

Un arbre non enraciné est une représentation intemporelle. Un arbre enraciné indique où se situe l'ancêtre commun des taxa, considéré comme la racine de l'arbre. La plupart des programmes de construction d'arbres phylogénétiques produisent des arbres non enracinés.

### 7.2. Méthodes de construction des arbres

Trois méthodes sont utilisées pour la construction des arbres :

Méthode des distances : fondée sur l'alignement multiple et le calcul des distances entre les séquences. La topologie de l'arbre est construite par la méthode de "Neighbor-joining" qui consiste à calculer les longueurs des branches, de telle manière à ce que les distances déduites de l'arbre soient les plus proches des distances mesurées. Méthode rapide qui ne donne de bons résultats que pour des séquences de forte similitude. C'est la méthode utilisée par CLUSTALW.

Méthode de parcimonie : fondée sur la recherche de l'arbre le plus parcimonieux parmi tous les arbres possibles, c'est à dire celui qui nécessite le moins de changements pour expliquer les différences observées entre les séquences. Méthode très lente par rapport à la méthode des distances.

Méthode du maximum de vraisemblance : fondée sur une méthode probabiliste qui recherche l'arbre optimal en attribuant une probabilité à chaque changement dans les séquences. Méthode la plus fiable mais longue et nécessitant une grande puissance de calcul.

### 7.3. Fiabilité des arbres obtenus

La fiabilité et la robustesse des topologies obtenues doivent être évaluées. Le Bootstrap est la méthode la plus souvent utilisée. Elle permet de tester la fiabilité des branches internes et d'évaluer la confiance que l'on peut avoir dans la topologie déterminée. On considère généralement que les branches ayant une valeur de bootstrap > 95 % sont fiables.

### 7.4. Autres outils

PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) : ensemble de programmes dédié à l'analyse phylogénétique. Il permet la construction d'arbres selon plusieurs méthodes (distances, parcimonie et maximum de vraisemblance). L'utilisation du programme nécessite un jeu de séquences déjà alignées.

## 8. Recherche de motifs et de domaines

Les motifs sont de courts segments ou expressions permettant de caractériser un ensemble de séquences nucléotidiques ou protéiques. Leur présence suggère généralement une fonction conservée au cours de l'évolution. Ils sont mis en évidence par un alignement multiple et sont représentés par des séquences consensus.

Dans le cas des protéines, leur recherche permet d'identifier les sites impliqués dans des fonctions biologiques particulières : catalyse, fixation d'un ligand, régulation, ...

### 8.1. Description et syntaxe

Les motifs sont décrits avec une syntaxe spécifique. Exemple de syntaxe Prosite :

- x représente n'importe quelle lettre ;
  - le tiret (-) est un séparateur des caractères ;
  - l'astérisque (\*) est un joker mis à la place d'un x quelconque ;
  - une lettre suivie d'un nombre entre parenthèse indique le nombre d'occurrences correspondant à la lettre ;
- exemple : P(3) : Pro-Pro-Pro ou x(2,4) : x-x ou x-x-x ou x-x-x-x ;
- un ensemble de lettres entre crochets indique une ambiguïté ;
- exemple : [ALT] signifie Ala ou Leu ou Thr ;
- une lettre ou un ensemble de lettres entre guillemets indique une exclusion ;
- exemple : {AM} signifie tout acide aminé sauf Ala et Met.

### 8.2. Exemples

Site de fixation des ribosomes chez les procaryotes (" Ribosome Binding Site " ou RBS)

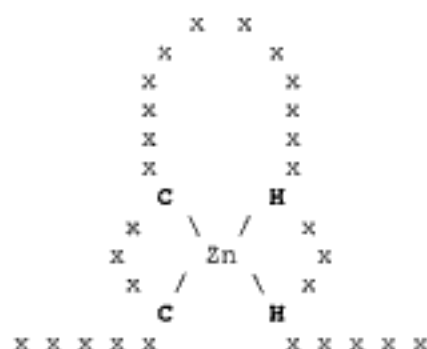
Séquence consensus de Shine-Dalgarno (AGGAGG) en amont du codon d'initiation ATG.

Site de fixation du FAD dans la fumarate réductase / succinate déshydrogénase

Motif consensus : R - [ST] - H - [ST] - x(2) - A - x - G - G

Domaine en doigt de zinc

C - x(2,4) - C - x(3) - [LIVMFYWC] - x(8) - H - x(3,5) - H



## 9. Analyse, visualisation et modélisation de structures

L'activité biologique des protéines et des ARN est intimement liée à la structure tridimensionnelle adoptée par ces biomolécules.

### 9.1. Visualisation des structures tridimensionnelles

Les données de structures des protéines et des acides nucléiques peuvent être stockées dans des fichiers de coordonnées atomiques qui spécifient la nature, la position spatiale de chaque atome ainsi que son appartenance à un résidu particulier.

Plusieurs logiciels de visualisation créent un environnement tridimensionnel virtuel qui donne l'illusion de la profondeur. Ces logiciels permettent également la manipulation des structures et l'exportation sous forme de fichiers images.

|                 | Adresse web                                                                                                               | Commentaires                                                                              |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chime           | <a href="http://www.mdl.com/products/framework/chime">http://www.mdl.com/products/framework/chime</a>                     | Téléchargement gratuit après inscription                                                  |
| Rasmol          | <a href="http://www.openrasmol.org">http://www.openrasmol.org</a>                                                         | Visualisation, manipulation. Pas de comparaison de structures                             |
| Cn3D            | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml</a> | Lié aux fichiers de la base MMDB structure du NCBI. Comporte une fenêtre pour la séquence |
| MAGE            | <a href="http://kinemage.biochem.duke.edu/index.php">http://kinemage.biochem.duke.edu/index.php</a>                       | Structures animées. Beaucoup d'exemples à télécharger. Pédagogique                        |
| Swiss-PdbViewer | <a href="http://www.expasy.org/spdbv">http://www.expasy.org/spdbv</a>                                                     | Complet et efficace. Consulter le tutorial                                                |
| AstexViewer     | <a href="http://www.astex-therapeutics.com/AstexViewer">http://www.astex-therapeutics.com/AstexViewer</a>                 | Comparaison de molécules avec fenêtre séquence. Reconnaît fichiers PDB                    |

Quelques logiciels et visionneuses pour structures tridimensionnelles.



Hidden page

## Énoncés des exercices

### Voyage à travers les banques de données bioinformatiques

Les trois premiers exercices, ainsi que leurs corrigés, sont intégralement présents sur le CD-ROM.

#### Exercice 1      **Le favisme**

Le recueil, le stockage et la distribution des données biologiques à travers les réseaux représentent un des objectifs majeurs de la bioinformatique. De très nombreuses banques de données généralistes ou spécialisées sont accessibles via des interfaces "web intuitives". Ces banques de données biologiques sont souvent liées entre elles par des liens nommés "links", "linkout" ou des "cross-references".

Le centre de ressources français **Infobiogen** est un portail important de services (accès aux banques de séquences, logiciels d'analyses bioinformatiques, ...). Il dispose notamment d'une excellente rubrique : le **Deambulium** pointant vers la plupart des ressources en bioinformatique.

Adresse : <http://www.infobiogen.fr>

1. À l'aide du Deambulium retrouver les banques générales de gènes humains.
2. Parmi ces banques générales, on retrouve **Orphanet**. Que recense la banque Orphanet ?
3. Sur le serveur de la banque Orphanet, retrouver la description du favisme.
4. La fiche se termine par un lien noté **MIM**. Vers quelle autre banque pointe-il ?
5. À l'aide du serveur de la banque précédemment identifiée, retrouver la localisation chromosomique de l'enzyme impliquée dans la maladie.
6. Retrouver le nom, l'identifiant et la structure du gène dans la base **GENE**.

#### Exercice 2      **Les voies métaboliques dans lesquelles est impliquée la glucose-6-phosphate déshydrogénase**

Le portail **KEGG** (" Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ") est une base de connaissances regroupant des informations sur les molécules biologiques, les gènes et les voies métaboliques. Il représente un excellent répertoire des voies métaboliques et des enzymes impliquées. Les principales rubriques sont :

- **Pathway** : recense toutes les voies métaboliques (38036 actuellement) connues chez les organismes vivants. Voir par exemple " human oxidative phosphorylation " ;
- **Genes** : catalogue des gènes connus et bien annotés ainsi que les génomes séquencés ;
- **Ligand** : catalogue des molécules biologiques et médicamenteuses avec leurs structures et leurs propriétés ;
- **Brite** : classification thématique des biomolécules et des voies métaboliques.

1. Retrouver le portail KEGG à l'aide d'un moteur de recherche.
2. Retrouver les réactions complètes de la voie des pentoses phosphates chez l'homme.
3. Indiquer le numéro de classification de l'enzyme et la réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase.
4. Récupérer les structures des molécules impliquées dans cette réaction à partir de la voie métabolique.
5. Retrouver la fiche complète de l'enzyme dans KEGG. Dans quelle autre voie l'enzyme est-elle impliquée ?

#### Exercice 3      **Structure de la glucose-6-phosphate déshydrogénase humaine**

Le portail **Expasy** (" Expert Protein Analysis System ") est un serveur de protéomique dédié à l'analyse des séquences et des structures protéiques.

Adresse : <http://www.expasy.org>

Il rassemble :

- **Swiss-Prot** : une banque de séquence protéique annotées manuellement ;
- **ENZYME** : une base de données consacrée aux enzymes, leur nomenclature et leur classification ;
- **SWISS-2D-PAGE** : des données de protéines identifiées par électrophorèse sur gel polyacrylamide ;
- **Swiss-Model** : outil de modélisation 3D par homologie
- "**Tools and software packages**" : des outils d'analyse et de traitement et de modélisation des protéiques.

1. À l'aide du numéro de classification de la G6PD retrouvez la fiche complète de l'enzyme sur le site **Expasy**.
2. Récupérer la séquence primaire de la protéine au format **FASTA**.
3. Repérer le lien qui renvoie vers la structure 3D disponible dans la base **PDB** ("Protein Data Bank").
4. Réaliser une fiche de synthèse sur cette enzyme.

**Exercice 4** Génome d'*Escherichia coli K12* et localisation du gène de la glucose-6-phosphate déshydrogénase

Le site du **NCBI** ("National Center for Biotechnology Information") est un portail d'information dans le domaine des biotechnologies. Il est complexe et riche en informations.

Les principales rubriques sont :

- **PubMed** : recense les publications scientifiques dans le domaine biomédical ;
  - **Nucleotide / protein** : permet l'accès aux séquences nucléotidiques et protidiques ;
  - **BLAST** (" Basic Local Alignment Search Tool ") : réalise l'alignement de séquences ;
  - **OMIM** (" Online Mendelian Inheritance in Man ") : recense les informations sur les maladies génétiques humaines ;
  - **TaxBrowser** (" Taxonomy Browser ") : rassemble les informations sur la classification des espèces ;
  - **Structure** : est une banque de modèles moléculaires en 3D des protéines et des acides nucléiques.
- Dans le bandeau à droite intitulé **Hot spots** on peut accéder directement à des outils tels que :
- **ORF finder** : recherche de cadre ouvert de lecture ;
  - **Vecscreen** : recherche de fragments nucléiques provenant de vecteurs de clonage.

1. En accédant au **TaxBrowser**, retrouver la taxonomie complète d'*Escherichia coli K12*.
2. Après interrogation de la base **Genomic project** retrouver toutes les informations concernant le génome d'*E.coli K12*. Quelle est la taille du génome, le % G + C, la référence de la séquence complète du génome dans la banque **RefSeq** ?
3. A l'aide d'une requête dans la base **GENE** retrouvez le gène *zwf* de la G6PD.
4. Récupérer la fiche complète de la protéine codée par ce gène (code de la forme : NP\_XXXXXX).

**Exercice 5** Bibliographie sur la glucose-6-phosphate déshydrogénase et son rôle dans l'anémie

La recherche bibliographique a pris un nouvel essor avec les bases de données en ligne. La diffusion partielle ou totale des articles scientifiques est largement répandue sur le web et des revues entièrement électroniques de haut niveau ont vu le jour. La base de données **PubMed** recense la majorité des articles parus dans le domaine de la biologie.

On souhaite rassembler une documentation concernant le rôle de la G6PD dans l'anémie.

1. Retrouver une liste de publications exhaustive sur la G6PD en relation avec l'anémie.

Données : ne pas oublier que :

- déshydrogénase se dit "dehydrogenase" en anglais ;
- la référence à l'anémie est à faire figurer dans la requête sous forme de " deficiency anemia ".

2. Limiter le nombre de réponses aux publications des 3 dernières années.
3. Retrouver quelques livres qui traitent de ce thème.

**Exercice 6** La glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Leuconostoc mesenteroides*

L'Institut de Bioinformatique Européen **EBI** ("European Bioinformatics Institute"), fait partie de l'**EMBL** ("European Molecular Biology Laboratory"). Il a pour mission de créer, maintenir et de diffuser des bases de données d'information dans les domaines de la biologie moléculaire et de la génomique. Dans la rubrique **Bioinformatics Products and Services** du portail, il propose un ensemble de services et d'outils pour la bioinformatique.

Adresse : <http://www.ebi.ac.uk/services>

Deux rubriques principales

- **Toolbox** : outils de bioinformatique classés par thème dont les principaux sont les outils d'analyse et de comparaison de séquences (Blast, Fasta, Align, Clustalw)
- **Databases** : bases de données de séquences (EMBL, Uniprot...) et des systèmes d'interrogation tel que SRS.

1. A partir du système d'interrogation **SRS** d'**EBI** retrouver la séquence de la G6PD de *Leuconostoc mesenteroides*. Indiquez le numéro d'accèsion de la séquence.

Donnée : le nom de l'enzyme à utiliser dans la requête est " glucose phosphate dehydrogenase ".

Adresse : <http://srs.ebi.ac.uk>

2. Quel est le code de la structure 3D de cette enzyme dans la base PDB ("**Protein Data Bank**") ? Récupérer le fichier de coordonnées et visualiser la structure à l'aide du module **Chime** ou d'autres visionneuses.

Hidden page

**Exercice 10** Alignement global de séquences d'acides aminés

On considère les séquences suivantes (cf. *cdérom* : *sequences10.txt*):

Séquence 1 : VL.SMDLFLTKVKYR  
Séquence 2 : VASLDKFLSKYR

On cherchera l'alignement global optimal avec le logiciel **Needle** du serveur **EBI**.

1. Quelle est la matrice de score utilisée ? Quelles sont les pénalités appliquées ? Rechercher l'alignement global optimal en gardant les paramètres par défaut. Enregistrer le fichier de résultats.
2. Que signifient les symboles utilisés " | ", " : ", " . " ?
3. Que se passe-t-il si on applique une pénalité d'extension de -5 ?

**Exercice 11** Localisation d'introns d'un gène par alignement global de séquences

On se propose de déterminer la structure du gène de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine humaine par alignement global des séquences du gène et de son ARNm.

1. Récupérer les séquences d'ADN et d'ARNm du gène de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine humaine.
2. Réaliser un alignement global à l'aide du logiciel **Align** du site **EBI**. Combien d'exons comporte le gène de la chaîne bêta de l'hémoglobine ?
3. Visualiser cet alignement avec un logiciel de type dot-plot (**dottup**, **dotter**, **dotplot**).

Adresse : <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dottup.html>

**Exercice 12** Alignement global des séquences de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine

1. A partir du site **Expasy**, récupérer au format FASTA les séquences des chaînes  $\beta$  de l'hémoglobine humaine et du gorille. Enregistrer les séquences au format FASTA.
2. Réaliser un alignement global (utilisation de **needle** sur EBI) sur les deux séquences.
3. Comparer les scores de similarité et d'identité. Conclure.

**Exercice 13** Recherche de séquences similaires avec BLAST

Après la détermination de la séquence d'une biomolécule, l'étape suivante consiste à prédire sa structure et sa fonction. La comparaison par alignement avec des séquences similaires et connues, dans les banques de données, constitue la première étape de l'analyse bioinformatique.

Les programmes **BLAST** effectuent une recherche très rapide dans les banques de séquences nucléiques et protéiques avec une estimation statistique de la signification des résultats.

On se propose de comparer avec **Blastn** une séquence nucléique provenant du génome humain avec les séquences des banques nucléiques (cf. *fichier cdérom* : *seq\_exo13.txt*).

```
AATCTCAGCACCATGAGGTTCTGCACCATCTCCTTGCCCAGGTAGTGGTCGATGCGGTAGATCTGGTCCTCACGGAACA
GGGAGGAGATGTFGGTTGGACAGCCGGTCAGAGCTCTGCAGGTCCCTCCCGAAGGGCTTCTCCACGATGATGCGGTTCC
AGCCTATCTGGCTCATGCAGGACTCGTGAATGTTCTTGGTGACGGCCTCGTAG
```

1. En s'appuyant sur l'aide en ligne de **Blastn** indiquer la significations des principaux paramètres du formulaire d'interrogation.

Adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

2. Sur quel paramètre peut-on agir pour accélérer la recherche ?
3. Sur quel paramètre peut-on agir pour augmenter la sélectivité de la recherche ?
4. Lancer la requête avec le bouton **BLAST!** puis **Format!**. Analyser les résultats obtenus et donner la signification du score et de la E-valeur.

**Exercice 14** Vérification de la qualité d'un ADN de fossile

En 1992, Desalle et ses collaborateurs ont extrait et amplifié par PCR un segment d'ADN d'un termite *Mastotermes electrodominicus* retrouvé dans l'ambre fossilisé. La séquence du fragment amplifié a pour numéro d'accès dans **GENBANK** (**S45649**)

1. Récupérer la séquence nucléotidique de l'ADN amplifié.
2. Pour quel gène code-t-il ?
3. Comment peut-on vérifier que l'ADN extrait provient bien de l'ADN de l'insecte et non d'un contaminant ?
4. Comment expliquer que la valeur de E-valeur soit plus faible que celle de l'exercice précédent alors même qu'il y a correspondance parfaite entre les séquences ?

Hidden page

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Le favisme

1. Dans le site **INFOBIOGEN**, chemin à suivre à partir de la page du **Deambulium > Banques de données > Génomes et organismes > Homme > Banques générales de gènes humains**.

Adresse : <http://www.infobiogen.fr>

2. Le site **ORPHANET** recense les informations sur les maladies rares et les médicaments orphelins. Sélectionner "**Maladies rares et médicaments orphelins**" et introduire le terme "favisme" dans le moteur de recherche interne.

Adresse : <http://www.orpha.net>

3. On retrouve la fiche **ORPHA362** correspondant à la fiche **CIM E74.8** dans le code de la classification OMS. Elle décrit la maladie.

Court résumé : le **favisme** est un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD ou en anglais "glucose-6-phosphate dehydrogenase") qui peut se traduire par un ictère néonatal ou une anémie hémolytique aiguë d'intensité variable. Cette dernière est déclenchée par les infections, par la prise de certains médicaments (dont certains antipaludéens) ou lors de l'ingestion de fèves (d'où le terme "favisme") qui provoque un stress oxydatif.

4. Le lien **MIM 305900** pointe vers la banque **OMIM** ("Online Mendelian Inheritance in Man") qui recense les informations sur les maladies génétiques chez l'homme.

Adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

5. Au début de la page (voir ci-dessous) se trouve un lien intitulé : **Gene map locus Xq28** (chromosome X bras long, bande 2 sous bande 8) qui pointe vers le locus de la G6PD. En suivant ce lien, on se retrouve dans le **OMIM gene map**. En cliquant sur **Xq28**, on se retrouve dans le **NCBI Mapviewer**. Cliquer sur G6PD pour accéder à la fiche dans la base **Entrez Gene**.

**OMIM**  
Online Mendelian Inheritance in Man

Johns Hopkins University

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome

Search OMIM for Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Detailed Show 20 Send to

All: 1

**+305900**

**GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE; G6PD**

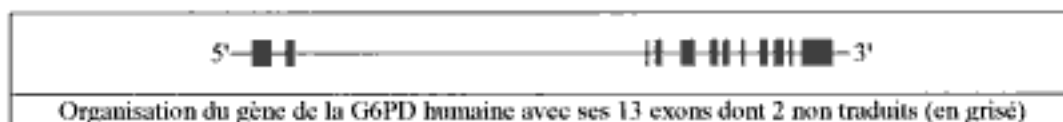
*Alternative titles; symbols*

**ANEMIA, NONSPHEROCYTIC HEMOLYTIC, DUE TO G6PD DEFICIENCY, INCLUDED**

Gene map locus Xq28

Fiche OMIM 305900 du déficit en G6PD avec le lien de la localisation chromosomique

6. Nom du gène **G6PD**, GeneID : 2539



Remarque : le résultat obtenu confirme le fait que la proportion des introns est importante dans les gènes eucaryotes.

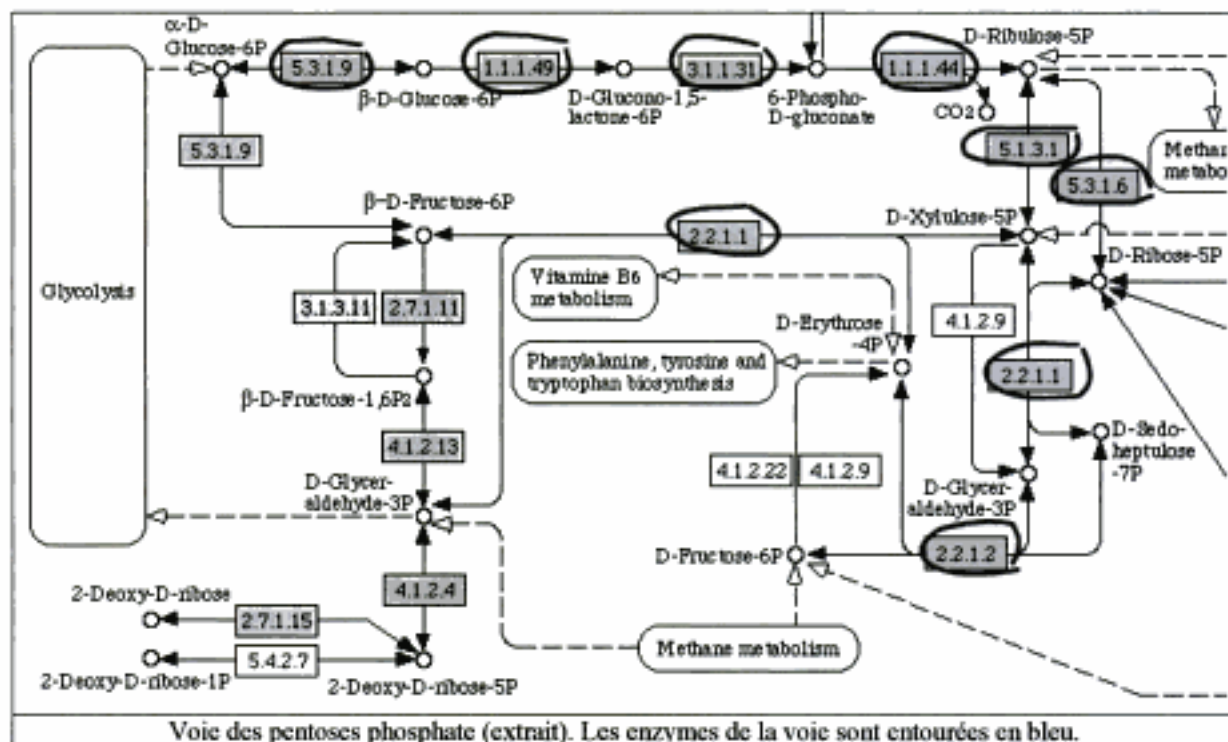
## Exercice 2 Les voies métaboliques dans lesquelles est impliquée la glucose-6-phosphate déshydrogénase

1. Une requête simple avec le mot **KEGG** dans un moteur tel que **Google** permet de retrouver l'adresse du portail KEGG.

Adresse : <http://www.genome.jp/kegg>

2. Une requête dans la rubrique **Pathway** avec les mots clés : " **pentose phosphate human** " permet d'obtenir le code d'accèsion **hsa00030**. Ce code donne accès à la voie des pentoses phosphate.

Adresse : [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?path:hsa00030](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?path:hsa00030)



3. Le glucose-6-phosphate déshydrogénase a pour code dans la classification des enzymes : **EC 1.1.1.49**. Il s'agit d'une oxydo-réductase (classe 1). La réaction catalysée est :



4. Un simple clic sur le nom du composé dans la page de la voie métabolique permet de récupérer la structure et diverses autres informations le concernant. Idem pour les autres métabolites impliquées dans la voie.

5. Un clic sur le numéro de classification de l'enzyme permet d'afficher la fiche complète de l'enzyme avec les séquences nucléotidique et protéique.

Adresse : [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?hsa:2539](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa:2539)

L'examen de cette fiche montre, à la rubrique **Pathway**, que la glucose-6-phosphate déshydrogénase intervient dans le métabolisme du glutathion (code d'accèsion **hsa00480**).

Le glutathion est un tripeptide qui joue un rôle d'antioxydant dans le métabolisme. La G6PD catalyse la réaction d'oxydo-réduction du glutathion (oxydation des groupements thiol).

| KEGG Homo sapiens (human): 2539 |                                                                                   | Help |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------|
| Entry                           | 2539 CDS H.sapiens                                                                |      |
| Gene name                       | G6PD                                                                              |      |
| Definition                      | glucose-6-phosphate dehydrogenase [EC:1.1.1.49]                                   |      |
| KO                              | KO: K00036 glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase<br>OC search OC viewer             |      |
| Pathway                         | PATH: hsa00030 Pentose phosphate pathway<br>PATH: hsa00480 Glutathione metabolism |      |

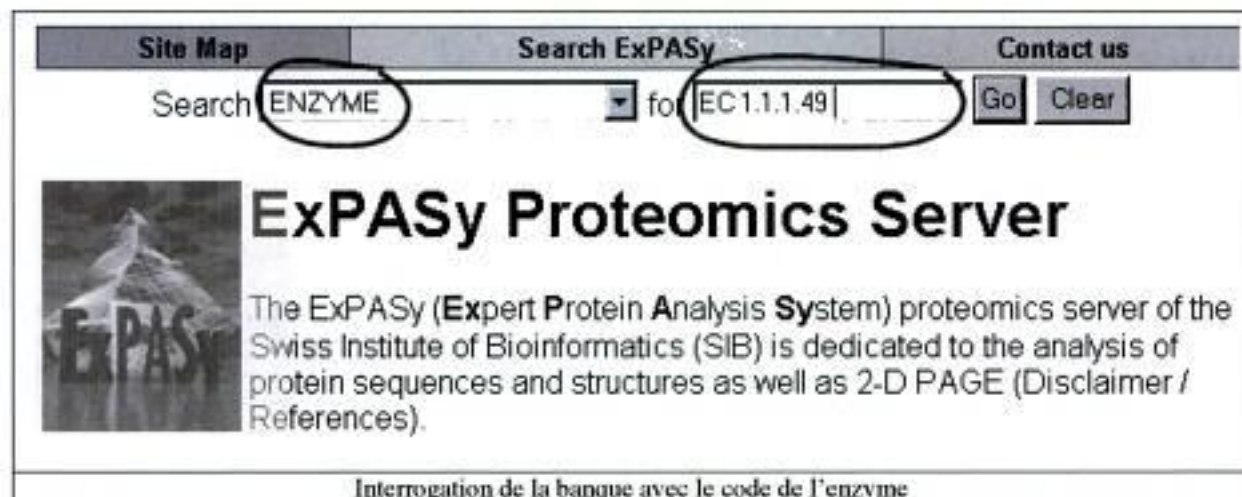
Extrait de la fiche de la G6PD dans la base KEGG



**Exercice 3** La glucose-6-phosphate déshydrogénase humaine

1. Une interrogation de la banque **ENZYME** du portail **EXPASY** à l'aide du code de classification **EC 1.1.1.49** permet de retrouver la liste des enzymes provenant de différents organismes.

Adresse : <http://www.expasy.org>



Site Map Search ExPASy Contact us

Search **ENZYME** for **EC1.1.1.49** Go Clear

**ExPASy Proteomics Server**

The ExPASy (**Expert Protein Analysis System**) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) is dedicated to the analysis of protein sequences and structures as well as 2-D PAGE (Disclaimer / References).

Interrogation de la banque avec le code de l'enzyme

Dans la liste on peut repérer le code de la G6PD humaine (**P11413, G6PD\_HUMAN**)

Adresse : <http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P11413>

2. Le fichier de la structure primaire de la protéine (514 acides aminés) peut être récupéré au format **FASTA** grâce au lien situé en bas à droite de la fiche de l'enzyme. Ce format de fichier comporte un commentaire précédé du symbole > suivi de la séquence en acides aminés codés en lettres avec 80 caractères maximum par ligne.

```
>sp|P11413|G6PD_HUMAN Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
(EC 1.1.1.49) (G6PD) - Homo sapiens (Human).

AEQVALSRTHVCGILREELFQGDADFHQSDTHIFIMGASGDLAKKKIYPTIWFLFRDGLL
PENTFIVGYARSRLTVADIRKQSEPFKATPEEKLKLEDFFARN SYVAGQYDDAASYQRL
NSHMNALHLGSQLRFLPYLALPPTVYEAVTKNIHESCMSQIGWNRIIVEKPFGRDLQSSD
RLSNHISLRFREDQIYRIDHYLGKEMVQNLMLVLRANRIFGPIWNRDNIACVILTFFKEPF
GTEGRGGYFDFEFGIIRDVMQNHLLQMLCLVAMEKPASTNSDDVDRDEKVKVLKCI SEVQAN
NVVLGQYVGNPDGEGEATKGYLDDPTVPERGSTTATFAAVVLYVENERWDGVPFILRCGKA
LNERKAEVRLQFHDVAGDIFHQCKRNELVIRVQPN EAVYTKMMTKKPGMFFNPEESEL D
LTYGNRYKNVKLPDAYERLILDFVFCGSQMHFVRSDELREAWRI FTPLLHQIELEKPKPI P
YIYGSRGPTAEDEL MKRVGFQYEGTYKWNPHKL
```

Séquence en acides aminés (code à une lettre) de la G6PD humaine au format FASTA

3. La rubrique **3D structures databases** fournit plusieurs liens qui renvoient vers le fichier **PDB** (code **1QKI**). Trois banques proposent des structures 3D (**EXPASY, PDB, EBI**).

Adresse fiche RCSB : <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1QKI>

Il s'agit de la structure d'une variante de l'enzyme mutée (Arg459-Leu) déterminée par cristallographie. Elle se présente sous forme de dimère de dimères. On peut également faire une comparaison dynamique entre monomères.

Adresse : [http://www.expasy.ch/cgi-bin/get-sprot-variant.pl?VAR\\_002451](http://www.expasy.ch/cgi-bin/get-sprot-variant.pl?VAR_002451)

4. Éléments de synthèse :

- Déficit en G6PD (Favisme) : maladie héréditaire liée au sexe provoquant des anémies hémolytiques. Maladie aggravée par un stress oxydatif (ingestion de fèves) ;
- fiche OMIM (NCBI) : 305900 ;
- Locus du Gène : Xq28. Identifiant dans la banque GENE du NCBI : 2539 ;
- Numéro d'accèsion de la protéine : P11413 ;
- Enzyme (EC 1.1.1.49) impliquée dans la voie des pentoses phosphate et dans le métabolisme du glutathion ;
- Existe sous forme de dimère ou de tétramère. Fichier structure 3D dans RCSB : 1QKI.

Hidden page

Hidden page

**Exercice 5 Bibliographie de la glucose-6-phosphate déshydrogénase d'*E.coli***

1. A partir de la page d'accueil du NCBI, on sélectionne la rubrique PubMed. La requête à utiliser est : " glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency anemia ". On obtient une longue liste de réponses concernant des articles de recherche ainsi que des articles de synthèse ("Review").

Adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

The screenshot shows the NCBI PubMed search interface. The search query "glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency anemia" is entered in the search bar. The results show "All: 3771" and "Review: 366". A sample result is displayed for the article "Acute massive haemolysis in children with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency" by Lau HK, Li CH, Lee AC, published in Hong Kong Med J in 2006. The page is titled "Résultat de la requête de PubMed".

2. En précisant dans **Limits**, les 3 dernières années, on obtient un nombre de réponses plus faible. D'autres filtres peuvent être appliqués pour affiner la recherche.

3. Une interrogation de la banque **Books** avec "glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency" permet un accès complet au livre "Biochemistry" (auteur Stryer) susceptible de donner des explications sur le déficit de la G6PD et sur son rôle dans l'anémie.

Adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

The screenshot shows the NCBI Bookshelf search interface. The search query "glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency" is entered. The results show "All: 23" and "Figures: 1". The search results list several books, including "9 items in Health Services/Technology Assessment Text (HSTAT)", "4 items in Medical Microbiology, 4th ed" by Baron, Samuel, editor, and "2 items in Biochemistry" by Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L., and Stryer, Lubert. The page is titled "Recherche de livres dans Books".

**Exercice 6** La glucose 6 phosphate déshydrogénase de *Leuconostoc mesenteroides*

1. Dans le portail de l'EMBL, il faut sélectionner, dans un premier temps, la base de données de séquences dans "Library page" et saisir dans le formulaire "Query form" la requête dans un second temps.

Adresse : <http://srs.ebi.ac.uk>

EMBL-EBI  
European Bioinformatics Institute

Quick Search Library Page Query Form Tools Results Projects Views Databanks

Reset search UniProtKB/Swiss-Prot

Search Options

Combine search terms with: & (AND)

Use wildcards

Get results of type: Entry

| Fields you can search | Your search terms               |
|-----------------------|---------------------------------|
| AllText               | glucose phosphate dehydrogenase |
| Organism Name         | leuconostoc mesenteroides       |
| AllText               |                                 |
| AllText               |                                 |

Search

Interrogation de la base Swiss-Prot avec SRS

2. La page de réponse renvoie vers la fiche P1114 du portail EXPASY qui correspond à la fiche complète de l'enzyme avec sa structure primaire.

Adresse : <http://www.expasy.org/uniprot/P11141>

3. Dans la fiche, il faut repérer la rubrique PDB qui donne le code du fichier 3D : IDPG. Une interrogation de la base PDB permet de récupérer le fichier utilisable par chimie (menu à gauche download files).

RCSB PDB  
PROTEIN DATA BANK

An Information Portal to Biological M.  
As of Tuesday May 09, 2006 there are 36428 Stru

Contact Us | Help | Print Page

PDB ID keyword Author IDPG SEARCH

Home Search Structure Queries

Home

Welcome to the RCSB PDB

The RCSB PDB provides a variety of tools and resources for studying the structures of biological macromolecules and their relationships to sequence, function, and disease.

Interrogation de la base PDB

Plusieurs visionneuses sont disponibles en ligne et donnent des images de grande qualité. Ci-dessous une capture d'écran de la visionneuse KING de Kincimages.

Adresse : <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=IDPG>



**Exercice 7 Traitements de base d'une séquence**

1. Dans **sms2**, sélectionner l'outil **DNA stats**. Insérer la séquence dans la zone du formulaire par simple "copier coller" et cliquer sur **submit**. On obtient le résultat suivant (résultat partiel) :

| Bases  | G     | A     | T     | C     | G,C   | A,T   |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nombre | 32    | 23    | 25    | 28    | 60    | 48    |
| %      | 29,63 | 21,30 | 23,15 | 25,93 | 55,56 | 44,44 |

Outil présent dans le cdrom

Adresse en ligne : <http://bioinformatics.org/sms2/>

2. Sélectionner **Reverse complement**, insérer la séquence dans la zone du formulaire et choisir dans le menu déroulant l'opération souhaitée et cliquer sur **submit**. On obtient rapidement la séquence complémentaire et la complémentaire inverse.

**SMS** Sequence Manipulation Suite:  
Reverse Complement

Reverse Complement converts a DNA sequence into its reverse, complement, or reverse-complement counterpart. The entire IUPAC DNA alphabet is supported, and the case of each input sequence character is maintained. You may want to work with the reverse-complement of a sequence if it contains an ORF on the reverse strand.

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 100000 characters.

ATGACGCTCGCGCAGTTTGCCATGATTTTCTGGCAGCAGCTGGCAGCACCAGATCCTGGCGGGAATTATTACCGCAGCGATTGTCAGCTGGTGGCGTAACCGGAAGTAA

Zone de saisie

Please check the browser compatibility page before using this program.

Submit Clear Reset

reverse-complement Zone d'options

Interface SMS. Séquence complémentaire et complémentaire inverse

Séquence complémentaire

3'-TACTGCGAGCGCGTCAAACGGTACTAAAAGACCGTGCTGGACCGTCGTGGCTAGGACCGCCTTAATAATGGCGTCGCTAACAGTCGACCACCGCATTGGCCTTCATT-5'

Séquence complémentaire inverse

5'-TTACTTCCGGTTACGCCACCAGCTGACAATCGCTGCGGTAATAATCCCGCCAGGATCGGTGCTGCCAGGTCGTGCCAGAAAATCATGGCAAACCTGCGGAGCGTCAT-3'

3. L'outil **DNA pattern** indique la position du motif AGCT de la position 85 à 88.

4. L'outil **Restriction map** permet d'identifier le site de coupure d'*AhaI*. Le fichier de sortie comporte deux parties : un graphique indiquant les sites de coupure et un tableau avec les positions de coupure.

## Restriction Map results

cuts once  
cuts twice  
cuts three times

Results for linear 108 residue sequence "Untitled" starting "ATGACGCTCG"

```

MboI |gatc 51
NdeII |gatc 51

AccII cg|cg 11
BstUI cg|cg 11
1 ATGACGCTCGCGCAGTTTGCATGATTTTCTGGCACGACCTGGCAGCACCGATCCTGGCG
1 TACTGCGAGCGGTCAAACGGTACTAAAAGACCGTGCTGGACCGTCGTGGCTAGGACCGC

HpaII c|cgg 100
MspI c|cgg 100

AluI ag|ct 87
PvuII cag|ctg 87
61 GGAATTATTACCGCAGCGATTGTCAGCTGGTGGCGTAACCGGAAAGTAA
61 CCTTAATAATGGCGTCGCTAACAGTCGACCACCGCATTGGCCTTCATT

```

Graphique généré par l'utilitaire **Restriction Map**.

5. La traduction de la séquence donne : M-T-L-A-Q-F-A-M-I-F-W-H-D-L-A-A-P-I-L-A-G-I-I-T-A-A-I-V-S-W-W-R-N-R-K-  
L'étoile indique un codon stop.

6. Résultat de la traduction dans la première phase de lecture : Met-Thr-Leu-Ala-Gln-Phe-Ala-Met-Ile-Phe-Trp-His-Asp-Leu-Ala-Ala-Pro-Ile-Leu-Ala-Gly-Ile-Ile-Thr-Ala-Ala-Ile-Val-Ser-Trp-Trp-Arg-Asn-Arg-Lys\*\*\*

7. L'utilisation de l'outil **Protein Stats** donne le résultat suivant :

| Acide aminé            | Nombre | %     |
|------------------------|--------|-------|
| A                      | 7      | 19,44 |
| C                      | 0      | 0,00  |
| D                      | 1      | 2,78  |
| E                      | 0      | 0,00  |
| F                      | 2      | 5,56  |
| G                      | 1      | 2,78  |
| H                      | 1      | 2,78  |
| I                      | 5      | 13,89 |
| K                      | 1      | 2,78  |
| L                      | 3      | 8,33  |
| M                      | 2      | 5,56  |
| N                      | 1      | 2,78  |
| P                      | 1      | 2,78  |
| Q                      | 1      | 2,78  |
| R                      | 2      | 5,56  |
| S                      | 1      | 2,78  |
| T                      | 2      | 5,56  |
| V                      | 1      | 2,78  |
| W                      | 3      | 8,33  |
| Y                      | 0      | 0,00  |
| Aliphatiques G,A,V,L,I | 17     | 47,22 |
| Aromatiques F,W,Y      | 5      | 13,89 |
| Soufrés C,M            | 2      | 5,56  |
| Basiques K,R,H         | 4      | 11,11 |
| Acides D,E,N,Q         | 3      | 8,33  |
| Aliphatic hydroxyl S,T | 3      | 8,33  |

**Exercice 8 Traduction d'une séquence nucléotidique et recherche des cadres ouverts de lecture****1. Traduction du brin 5' → 3' présenté dans les 3 phases de lecture**Adresse : <http://www.expasy.org/tools/dna.html>

|    |                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| +1 | atg acg ctc gcg cag ttt gcc atg att ttc tgg cac gac ctg gca gca cgg atc ctg<br>M T L A Q F A M I F W H D L A A P I L<br>gcg gga att att acc gca gcg att gtc agc tgg tgg cgt aac cgg aag taa<br>A G I I T A A I V S W W R N R K - |
| +2 | a tga cgc tgc cgc agt ttg cca tga ttt tct gcc acg acc tgg cag cac cga tcc<br>- R S R S L P - F S G T T W Q H R S<br>tgg cgg gaa tta tta cgg cag cga ttg tca gct ggt gcc gta acc gga agt aa<br>W R E L L P Q R L S A G G V T G S  |
| +3 | at gac gct cgc gca gtt tgc cat gat ttt ctg gca cga cct gcc agc acc gat cct<br>D A R A V C H D F L A R P G S T D P<br>ggc ggg aat tat tac cgc agc gat tgt cag ctg gtg gcg taa cgg gaa gta a<br>G G N Y Y R S D C Q L V A - P E V  |

Remarque : - : codon stop

**Traduction du brin complémentaire 3' → 5' inversé dans les 3 phases de lecture**

|    |                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| -1 | tta ctt cgg gtt acg cca cca gct gac aat cgc tgc ggt aat aat tcc cgc cag gat<br>L L P V T P P A D N R C G N N S R Q D<br>cgg tgc tgc cag gtc gtg cca gaa aat cat gcc aaa ctg cgc gag cgt cat<br>R C C Q V V P E N H G K L R E R H |
| -2 | t tac ttc cgg tta cgc cac cag ctg aca atc gct gcg gta ata att ccc gcc agg<br>Y F R L R H Q L T I A A V I I P A R<br>atc ggt gct gcc agg tgc tgc cag aaa atc atg gca aac tgc gcg agc gtc at<br>I G A A R S C Q K I M A N C A S V  |
| -3 | tt act tcc ggt tac gcc acc agc tga caa tgc ctg cgg taa taa ttc cgg cca gga<br>T S G Y A T S - Q S L R - - F P P G<br>tgc gtg ctg cca ggt cgt gcc aga aaa tca tgg caa act gcg cga gcg tca t<br>S V L P G R A R K S W Q T A R A S  |

2. Seule la traduction dans la phase +1 présente une séquence avec un codon d'initiation AUG et un codon stop sans interruption.

3. Le code génétique comporte 3 codons stop sur 64. La probabilité d'apparition au hasard d'un codon stop est de 3/64, soit environ un codon stop tous les 22 codons. Le résultat trouvé pour la phase de lecture +1 ne semble pas dû au hasard. La séquence comporte un codon d'initiation (ou codon "start") et un codon stop après 35 codons.

Il faut également noter que la longueur moyenne des protéines chez les organismes vivants est comprise entre 100 et 1000 résidus d'acides aminés ce qui donne des cadres ouverts de lecture comportant plus de 300 nucléotides

**Exercice 9 Alignement global de séquences nucléotidiques****1. Deux alignements possibles avec un score positif**

|   | Alignement                                                     | Identités | Transitions | Transversions | Brèches :<br>nombre<br>(nombre de<br>bases dans<br>chaque<br>brèche) | Total                                             |
|---|----------------------------------------------------------------|-----------|-------------|---------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1 | GAGTAATACACACATCGGCATGG<br>          <br>GAGAAATAGAGCATGG----- | 8         | 0           | 8             | 0                                                                    | 24+0-16=8 soit<br>(8.3 + 0.1 + 8.(-2))+<br>0.(-1) |
| 2 | GAGTAATACACACATCGGCATGG<br>: :   :      <br>GAGAAATAGAGCATGG   | 7         | 3           | 6             | 0                                                                    | 21+3-12=12                                        |

Le meilleur alignement est donc le second.



Hidden page

```
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
# Length: 23
# Identity: 14/23 (60.9%)
# Similarity: 14/23 (60.9%)
# Gaps: 7/23 (30.4%)
# Score: 49.0
#=====
séquence 1 1 GAGTAATACACACATCGGCATGG 23
           |||.||||.|         |||||
Séquence 2 1 GAGAAATAGA-----GCATGG 16
```

Extrait du fichier de sortie de résultats. (Fichier de résultat complet sur **cdrom exo9.txt**)

Le résultat obtenu avec **Needle** du serveur d'EBI confirme que l'alignement manuel n° 3 est optimal.

Le score obtenu est cependant différent car la matrice et les pénalités de brèches ne sont pas les mêmes. Il est à noter que le logiciel n'accepte pas la valeur -3 pour l'ouverture d'une brèche ("Gap Open"), ni la valeur -1 pour "Gap Extend".

4. L'ajout des brèches dans une séquence codant pour une protéine change le cadre de lecture et la séquence risque de ne plus avoir le même sens. L'introduction de 3 brèches provoque la perte d'un acide aminé mais permet de conserver le reste de la séquence intacte.

### Exercice 10 Alignement global de séquences d'acides aminés

1. Dans l'onglet "Services" du serveur EBI, cliquer sur le lien "Align" de "Sequence Analysis". Sélectionner "Protein" comme "molécule" et "Blosum62" comme "Matrix" ainsi que -10 / 0,5 pour brèche / extension. Introduire les séquences par "copier coller". On obtient ce qui est indiqué ci-dessous :

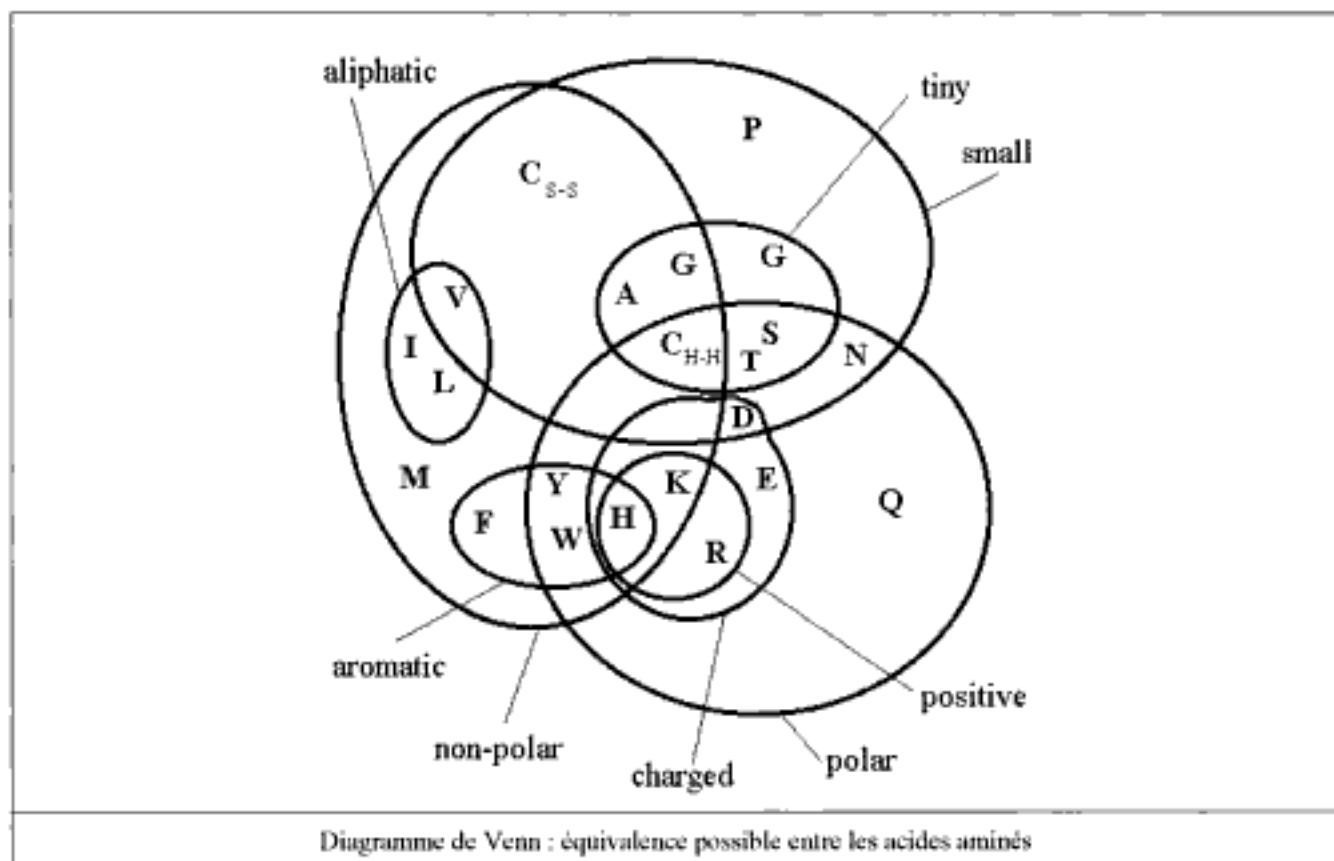
```
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
# Length: 14
# Identity: 8/14 (57.1%)
# Similarity: 10/14 (71.4%)
# Gaps: 2/14 (14.3%)
# Score: 30.5
#=====
Séquence 1 1 VLSMDLFLTKVKYR 14
           |.:|.||: |||
Séquence 2 1 VASLDKFLS--KYR 12
```

Extrait du fichier de résultats (Fichier de résultats complet sur **cdrom exo10.txt**)

2. Comme on peut le trouver dans l'onglet "Format",

"|" signifie identité (match)                    ":" signifie similarité                    ". ." signifie non-identité (mismatch)

Certains acides aminés ont des propriétés physico-chimiques proches. Ils peuvent se substituer les uns aux autres sans altérer la structure ni la fonction de la protéine (cas de Leu et de Met).



3. Comme on peut facilement le constater en modifiant la valeur de la pénalité, avec une pénalité de  $-5$ , le score obtenu est naturellement différent : le choix des paramètres influe sur le résultat obtenu. Ainsi, l'alignement ci-dessous devient préférable au premier.

|            |                  |    |
|------------|------------------|----|
| Sequence 1 | 1 VLSMDLFLTKVKYR | 14 |
|            | .: : : : : :     |    |
| Sequence 2 | 1 VASLDKFLSKYR   | 12 |

### Exercice 11 Localisation d'introns d'un gène par alignement de séquences

1. Dans le portail du **NCBI** sélectionner la base **NUCLEOTIDE** et introduire les mots clés suivants : " beta chain hemoglobin gene homo sapiens ". On pourra ainsi retrouver la séquence du gène et celle de l'ARNm.

Remarque : le numéro d'accèsion : NG\_000007 permet d'obtenir la séquence de la région chromosomique complète (81706 nt). Il faudra extraire la partie correspondant au gène de la chaîne bêta, à savoir uniquement de 70545 à 72150 correspondant à 1606 nt.

L'ARNm a pour numéro d'accèsion : NM\_000518

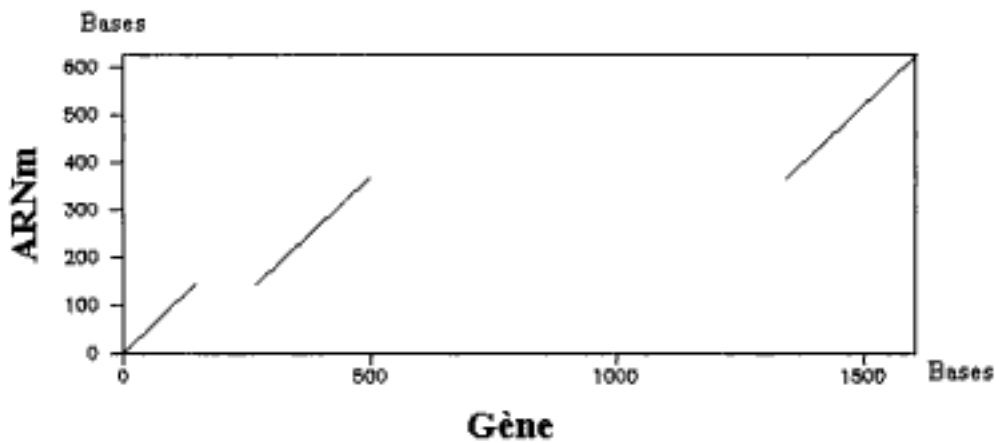
2. Dans **Align** de **EBI** Un alignement global permet de repérer les exons. Ceci montre une identité parfaite avec la séquence de l'ARNm. On obtient trois exons (fichier résultats : **cédérom exo11.txt**)

exon 1 : 1 - 140. Taille : 140 nt.

exon 2 : 271 - 494. Taille : 224 nt.

exon 3 : 1345 - 1606. Taille : 262 nt.

3. Le logiciel en ligne **Dotup** permet de réaliser un dotplot de manière simple et claire. Le champ email est obligatoire. Pour le format de sortie choisir **png** (" output section "):



Ceci confirme le résultat précédent : présence d'introns et d'exons.

On peut vérifier le résultat en examinant la structure du gène dans la base GENE avec le code d'accès 3043.

Remarque : il est également possible d'utiliser le logiciel à l'adresse <http://www.isrec.isb-sib.ch/java/dotlet/Dotlet.html> . Il est nécessaire d'avoir installé sur sa machine un environnement Java. (Java Runtime Environment).

### Exercice 12 Alignement global des séquences de la chaîne bêta de l'hémoglobine

1. Les numéros d'accès dans la banque **Swiss-Prot** sont : P68871 (HBB\_HUMAN) et P02024 (HBB\_GORGO)

2.

```
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
# Length: 146
# Identity: 145/146 (99.3%)
# Similarity: 146/146 (100.0%)
# Gaps: 0/146 (0.0%)
# Score: 772.0
#=====
HBB_GORGO      1  VHLTPEEKSAVTALWGKVVDEVGGEALGRLLVVPWTQRFESFGDLST      50
      |
HBB_HUMAN      1  VHLTPEEKSAVTALWGKVVDEVGGEALGRLLVVPWTQRFESFGDLST      50
      |
HBB_GORGO     51  PDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLNLRKGTFAITLSEHCDKLVHDP    100
      |
HBB_HUMAN     51  PDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLNLRKGTFAITLSEHCDKLVHDP    100
      |
HBB_GORGO    101  ENFKLLGNVLCVLAHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH      146
      |
HBB_HUMAN    101  ENFRLGNVLCVLAHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH      146
#=====
```

Extrait du fichier de sortie de Needle d'EBI.

3. La sortie de **Needle** indique que le score d'identité est de 99,3 % alors que la similarité est de 100 %.

Un seul acide aminé diffère entre les deux chaînes : Arg ↔ Lys. Ces deux acides aminés possèdent des chaînes latérales chargées positivement. La substitution est conservative, ce qui explique la similarité de 100 %.

**Exercice 13** Recherche de séquences similaires avec BLAST

## 1. Interrogation avec Blastn

NCBI *nucleotide-nucleotide* **BLAST**  
 Nucleotide Protein Translations Retrieve results for an RID

Search **>seq\_exo12**  
 AATCTCAGCACCATGAGGTTCTGCACCATCTCCTTGCCCAGGTAGTGGTCGATGCGGTAG  
 ATCTGGTCCTCACGGAACAGGGAGGAGATGTGGTTGGACAGCCGGTCAGAGCTCTGCAGG  
 TCCCTCCCGAAGGGCTTCTCCACGATGATGCGGTTCCAGCCTATCTGGCTCATGCAGGAC  
 TCGTGAATGTTCTTGGTGACGGCCCTCGTAG 1

Set subsequence From: \_\_\_\_\_ To: \_\_\_\_\_

Choose database nr 2

Now: **BLAST!** or **Reset query** **Reset all**

**Options** for advanced blasting

Limit by enter query \_\_\_\_\_ or select from: Homo sapiens [ORGN] 3

Choose filter  Low complexity 4  Human repeats  Mask for lookup table only  Mask lower case

Expect 10 5

Word Size 11 6

Page d'interrogation de Blastn du NCBI  
 1 : zone d'insertion de la séquence requête ;  
 2 : choix de la base de données à interroger. " nr " : signifie que les séquences proviennent de bases de données non-redondantes (Genbank, EMBL, DDBJ et PDB) ;  
 3 : choix de l'organisme ;  
 4 : filtre permettant d'éliminer les séquences dites de faible complexité (ADN répétitif, ...) ;  
 5 : nombre d'alignements que l'on s'attend à obtenir par hasard. Si E est faible, la sélectivité (stringence) est forte ;  
 6 : taille des mots W (cf résumé de cours)

Une région de faible complexité est une région contenant une très faible variété de caractères tels que les queues poly-A, les régions riches en proline, ... Ces régions ne sont donc pas alignées avec les séquences de la banque. Les caractères sont remplacés par des N dans le cas de l'ADN et par des X dans le cas des protéines.

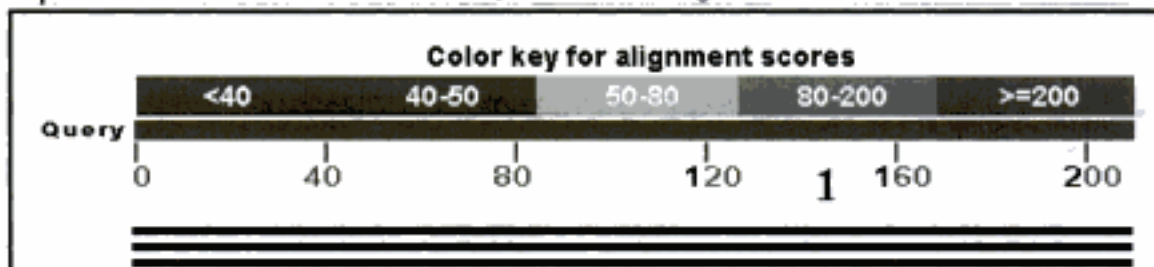
2. Si on augmente la taille des mots w (" wordsize ") de 11 à 15, par exemple, on diminue le temps de recherche mais ceci se fait au détriment de la sensibilité (élimination des faux-négatifs).

3. Si on diminue la valeur de l'Expect de 10 à 0,001 par exemple, la sélectivité augmente (stringence).

4. La séquence requête est un segment de la séquence nucléotidique du gène de la G6PD de l'homme.

### Distribution of 189 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



Sequences producing significant alignments:

2

| Score<br>(Bits) | E<br>Value |
|-----------------|------------|
|-----------------|------------|

|                                                                                  |     |        |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|--------|
| <a href="#">gi 33991065 gb BC000337.2 </a> Homo sapiens glucose-6-phosphate d... | 416 | 1e-113 |
| <a href="#">gi 21614519 ref NM_000402.2 </a> Homo sapiens glucose-6-phosphate... | 416 | 1e-113 |
| <a href="#">gi 30584816 db BT007989.1 </a> Synthetic construct Homo sapiens α... | 416 | 1e-113 |

>[gi|33991065|gb|BC000337.2|](#) **U E G** Homo sapiens glucose-6-phosphate dehydrogenase, MGC:8534 IMAGE:2822640), complete cds  
Length=2230

3

Score = 416 bits (210), Expect = 1e-113  
Identities = 210/210 (100%), Gaps = 0/210 (0%)  
Strand=Plus/Minus

|       |     |                                                              |     |
|-------|-----|--------------------------------------------------------------|-----|
| Query | 1   | AATCTCAGCACCATGAGGTTCTGCACCATCTCCTTGCCCAGGTAGTGGTCGATGCGGTAG | 60  |
|       |     |                                                              |     |
| Sbjct | 700 | AATCTCAGCACCATGAGGTTCTGCACCATCTCCTTGCCCAGGTAGTGGTCGATGCGGTAG | 641 |
| Query | 61  | ATCTGGTCTCACGGAACAGGGAGGAGATGTGGTTGGACAGCCGGTCAGAGCTCTGCAGG  | 120 |

La fenêtre de résultats se divise en trois parties :

- 1 : visualisation des scores d'alignement avec code couleur ;
- 2 : la liste des séquences donnant des scores significatifs ;
- 3 : le détail des alignements par pair ("pairwise") de la séquence requête et la séquence de la banque.

**Score** (" bits ") : il s'agit du **score d'alignement** normalisé déterminé à l'aide d'une matrice de score. Il mesure le degré de similarité entre les deux séquences. Plus sa valeur est élevée plus l'alignement est significatif.

Dans le cas présent le score du premier alignement est de 801 avec 404 bases identiques sans brèches.

Cet alignement a été obtenu avec les séquences dans leur phase 5'-3'.

**E-value** : ceci indique la probabilité que la séquence similaire retrouvée l'ait été par hasard dans la banque interrogée. Plus la E-value est faible, plus l'alignement est significatif. Si **BLAST** ne renvoie pas de réponse, il faudra certainement modifier la valeur de E afin de diminuer la stringence.

Dans le cas présent la E-value est nulle. L'alignement avec la séquence de la G6PD est parfait.

#### Exercice 14 Vérification de la qualité d'un ADN de fossile

1. Séquence de l'ADN amplifié :

```
>gi|256517|gb|S45649.1| 16S rRNA [Mastotermes electrodominicus=termites, amber-preserved fossil, Mitochondrial, 94 nt]
AATAAAATTTAATAAATATAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGGCCTTTAAAAATATTTAGCCTTTTGAC
AAAAAAAAAAAAAAAAATCTACAAAAAA
```

Fichier au format FASTA de la séquence S45649

2. Cette séquence code pour l'ARN 16S mitochondrial du termite *Mastotermes electrodominicus*.

3. On peut le vérifier en recherchant les séquences similaires dans les banques nucléiques à l'aide de **BLASTn**. Une interrogation des banques à partir du site du **NCBI** donne le résultat suivant :

| Sequences producing significant alignments:                                               | Score<br>(Bits) | E<br>Value |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------|
| <a href="#">gi 256517 gb S45649.1</a> 16S rRNA [ <i>Nastotermes electrodominicus</i> ...  | 139             | 1e-30      |
| <a href="#">gi 22037985 gb AF479799.1</a> <i>Drosophila ornaticipennis</i> 16S riboso...  | 93.7            | 6e-17      |
| <a href="#">gi 12005612 gb AF246514.1 AF246514</a> <i>Drosophila ornaticipennis</i> NA... | 85.7            | 2e-14      |
| <a href="#">gi 31282355 gb AY114186.1</a> <i>Lucilia caesar</i> 16S ribosomal RNA g...    | 83.6            | 8e-14      |
| <a href="#">gi 22037980 gb AF479794.1</a> <i>Rhinoleucophenga obesa</i> 16S ribosom...    | 83.6            | 8e-14      |
| <a href="#">gi 256518 gb S45650.1</a> 16S rRNA [ <i>Nastotermes darwiniensis</i> =ter...  | 83.6            | 8e-14      |
| <a href="#">gi 11119031 gb AF304735.1 AF304735</a> <i>Sphyracephala bipunctipenn</i> ...  | 83.6            | 8e-14      |
| <a href="#">gi 3552018 gb AF086859.1 AF086859</a> <i>Hystacinobia zealandica</i> lar...   | 83.6            | 8e-14      |

Le premier résultat montre la similitude parfaite qui correspond à la séquence requête elle-même. Les résultats suivants correspondent à des séquences d'insectes connus tel que *Drosophila melanogaster*, ce qui montre que l'ADN extrait ne provient pas d'un contaminant de laboratoire ou d'ADN bactérien.

4. La valeur de E Value dépend également du score de l'alignement S :

$$E \text{ Value} = k.m.n.e^{-\lambda S}$$

- avec
- m : taille de la séquence
  - n : taille de la banque
  - S : score de l'alignement
  - k et  $\lambda$  sont des paramètres caractérisant la banque de données.

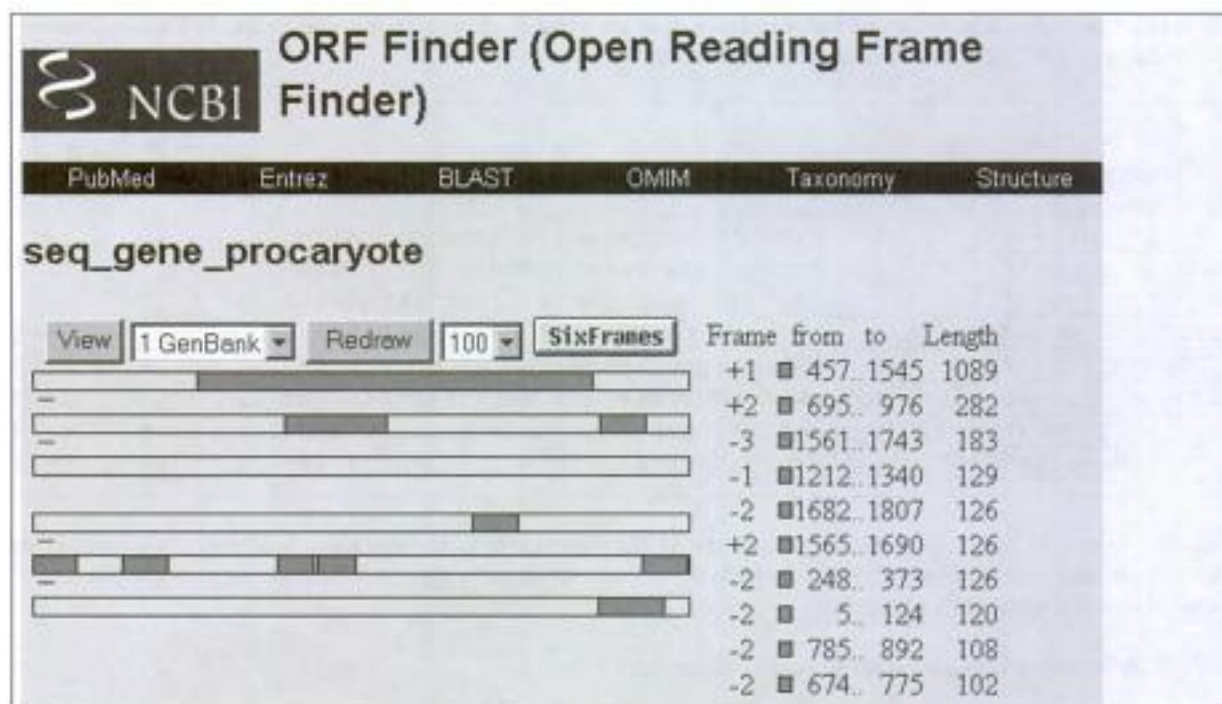
Donc si S diminue, E Value augmente. Dans le cas présent le score passe de 801 (exercice 13) à 70.

### **Exercice 15 Prédiction d'un gène procaryote : de la séquence nucléique à la structure 3D**

1. On obtient 10 ORF répartis comme suit :

- 1 ORF dans le cadre + 1 de 1089 nucléotides
- 2 ORF dans le cadre + 2 de 282 nucléotides et 126 nucléotides
- 1 ORF dans le cadre - 1 de 129 nucléotides
- 5 ORF dans le cadre - 2 de 120, 126, 102, 108 et 126 nucléotides
- 1 ORF dans la cadre - 3 de 183 nucléotides

2. Le tableau suivant montre que seul l'ORF comportant 1089 nucléotides donne un résultat statistique significatif avec blast. On obtient une séquence de 362 acides aminés codant pour une porine ompF.



### 3. Séquence d'acides aminés

MMKRNI LAVI VPALLVAGTANAAEI YNKDGNKVDLYGKAVGLHYFSKNGENSYGGNGDMTYARLGFKGE  
 TQINSDLTGYGQWEYNFQGNNEGADAQTGNKTRLAFAGLKYADVGSFDYGRNYGVVYDALGYTDMLPEF  
 GGDTAYSDDFFVGRVGGVATYRNSNFFGLVDGLNFAVQYLGKNERDTARRSNGDGVGGSISYEYEGFGIV  
 GAYGAADRTNLQEAQPLGNGKKAQWATGLKYDANNI YLAANYGETRNATPITNKFTNTSGFANKTQDVL  
 LVAQYQDFGLRPSIAYTKSKAKDVEGIGDVDLVNYFEVGATYYFNKNMSTYVDYIINQIDSDNKLGVGS  
 DDTVAVGIVYQF

Il s'agit du précurseur de la porine ompF. La séquence 1 à 22, comptée à partir du N-terminal, correspond au peptide signal.

### 4. Analyse de la séquence primaire (cf fichier cédérom : sortie\_protparam.htm)

- Masse molaire moléculaire : 39333,3 Daltons
- Point isoélectrique théorique : 4,76
- Composition en acides aminés :

|     |   | nombre | %      |
|-----|---|--------|--------|
| Ala | A | 34     | 9,4 %  |
| Arg | R | 12     | 3,3 %  |
| Asn | N | 32     | 8,8 %  |
| Asp | D | 27     | 7,5 %  |
| Gln | Q | 13     | 3,6 %  |
| Glu | E | 14     | 3,9 %  |
| Gly | G | 49     | 13,5 % |
| His | H | 1      | 0,3 %  |
| Ile | I | 14     | 3,9 %  |
| Leu | L | 23     | 6,4 %  |

|     |   | nombre | %     |
|-----|---|--------|-------|
| Lys | K | 19     | 5,2 % |
| Met | M | 5      | 1,4 % |
| Phe | F | 19     | 5,2 % |
| Pro | P | 5      | 1,4 % |
| Ser | S | 16     | 4,4 % |
| Thr | T | 22     | 6,1 % |
| Trp | W | 2      | 0,6 % |
| Tyr | Y | 29     | 8,0 % |
| Val | V | 26     | 7,2 % |

- Nombre total de résidus chargés négativement (Asp + Glu) : 41
- Nombre total de résidus chargés positivement (Arg + Lys) : 31

- Coefficient d'absorption molaire :  $54210 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , à 280 nm (pH = 6,5) ; ce coefficient dépend du nombre d'acides aminés tels que Tyr, Trp et Cystine.

- Estimation durée de vie : la demi-vie est supérieure à 10 heures chez *Escherichia coli*

La demi-vie est la durée au bout de laquelle 50 % de la protéine persiste après synthèse. Cette valeur dépend de la nature des acides aminés situés en position N-terminale. Certains acides aminés confèrent une durée de vie importante aux protéines in-vivo (Ala, Cys, Met, Thr, Val). Leur présence joue un rôle important dans la protéolyse médiée par l'ubiquitine.

- Indice d'instabilité : 13,81



Hidden page

Hidden page

2. L'alignement obtenu avec **T-COFFEE** montre 2 brèches entre 45 et 46 et entre 121 et 122

La séquence consensus déduite à partir de cet alignement est similaire à l'exception du G en position 47.

3. On retrouve le résultat classique du cours concernant la structure de l'hémoglobine : présence d'une histidine distale en position 63 et d'une histidine proximale en position 92. Ce sont ces deux acides aminés qui permettent la fixation de l'hème.

Hidden page

## **IV**

# ***PRINCIPALES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE***

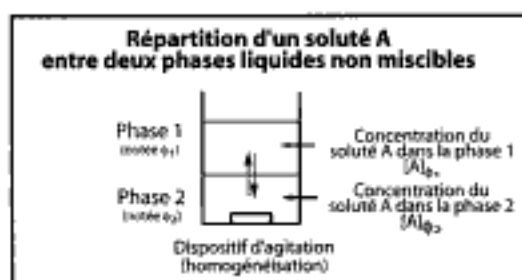
## 10 - Méthodes chromatographiques

### Etude théorique de la chromatographie

#### 1. Notion de plateaux théoriques

Dans cette approche théorique, la colonne chromatographique est considérée comme étant la juxtaposition de volumes identiques contenant tous les mêmes proportions de phase stationnaire ( $\phi_s$ ) et de phase mobile ( $\phi_M$ ). (Rappel : une phase est toute partie homogène d'un système). Ces phases ne sont pas miscibles (système non homogène) et par analogie avec la *distillation*, chaque volume ainsi défini peut être considéré comme un plateau d'une colonne à distiller, d'où le terme de "plateau théorique".

Chaque plateau peut être considéré comme un bûcher dans lequel une substance A en solution (soluté A) peut se répartir (se partager) entre deux solvants non miscibles (voir illustration ci-dessous et page suivante).



La phase  $\phi_1$  est assimilable à la phase mobile  $\phi_M$  et la phase  $\phi_2$  à la phase stationnaire  $\phi_S$ .

On définit expérimentalement le **coefficient de partage K** :

$$K = [A]_{\phi_S} / [A]_{\phi_M}$$

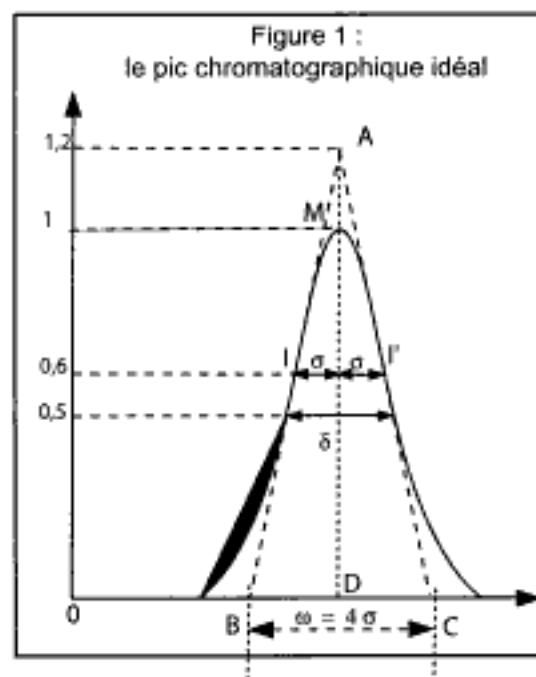
Il faut noter que le coefficient K dépend de la température.

Dans la colonne chromatographique, il y a un partage des divers solutés comme dans le bûcher, mais l'équilibre n'est jamais atteint : c'est un *équilibre dynamique*. Il est possible d'imaginer N bûchers (agités) constituant la colonne (modèle discontinu) ou plutôt une phase mobile  $\phi_M$  se déplaçant lentement devant une phase stationnaire  $\phi_S$  liquide immobilisée sur des particules avec réalisation de N équilibres (modèle continu) (voir schéma page suivante).

D'un point de vue technologique, l'évolution des phases stationnaires  $\phi_S$  s'est effectuée dans le sens d'une diminution de la taille des particules avec pour conséquence une augmentation de la difficulté de circulation de la phase mobile (augmentation des "pertes de charges"), d'où la nécessité d'augmenter la pression de l'éluant pour obtenir un débit acceptable. Cette haute pression a pu cependant être ramenée à des valeurs plus raisonnables (pression inférieure à 100 atm soit 10 MPa) par la confection de colonnes courtes à particules de parfaite sphéricité. C'est pourquoi, il faut parler, pour la chromatographie optimisée actuelle, de **chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC** ("High Performance Liquid Chromatography", en anglais) et non de chromatographie liquide à haute pression.

#### 1.1. Le pic chromatographique

Si l'on dépose une quantité unique d'une substance sur la colonne chromatographique et que l'on calcule la quantité de substance en fonction du volume de phase mobile  $\phi_M$  écoulé, on obtient une répartition gaussienne (la démonstration mathématique dépasse le cadre de cet ouvrage).



**Le pic chromatographique est assimilable à une courbe de Laplace - Gauss.** Une telle courbe (courbe "en cloche") est caractérisée :

- par son maximum M placé sur un axe de symétrie ;
- par deux points d'inflexion I et I' ;
- par l'écart type noté  $\sigma$ , au niveau des points d'inflexion.

Si, par convention, on attribue la valeur 1 à l'ordonnée de M, ces deux points d'inflexion ont une ordonnée voisine de 0,6.

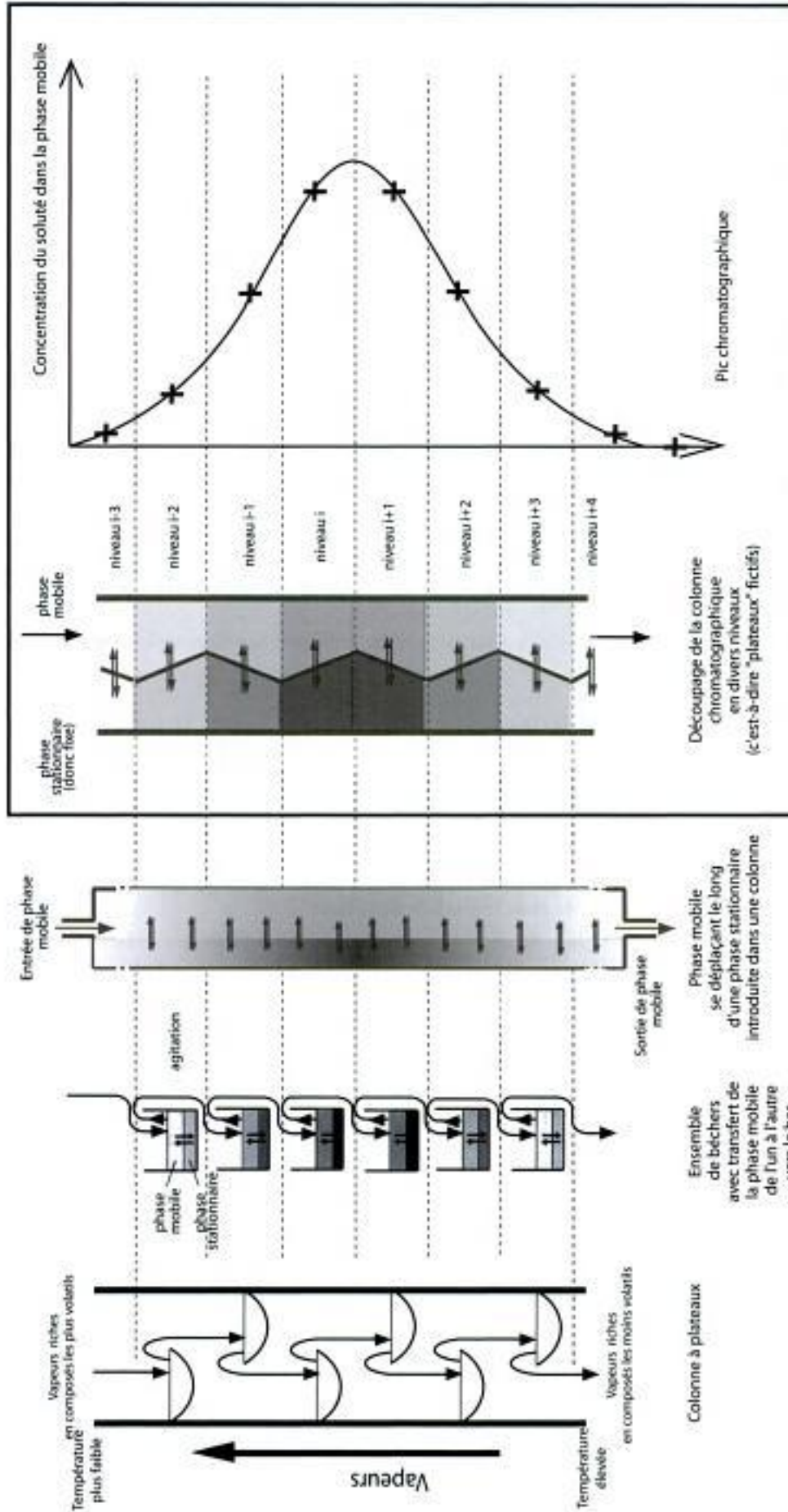
Le pic chromatographique peut être considéré comme inscrit dans un triangle isocèle ABC, dont les côtés sont tangents à la courbe aux points d'inflexion.

On a également :

- $\omega$  (largeur du pic à la base) =  $4 \cdot \sigma$
- $\delta$  ou  $\omega_{1/2}$  (largeur du pic à la mi-hauteur) =  $2,35 \cdot \sigma$

## De la colonne à distiller à la chromatographie sur colonne

Schématisation de la répartition d'un soluté dans une colonne de chromatographie



Modèle discontinu    Modèle continu

Modélisations

Colonne à distiller

Hidden page



Hidden page

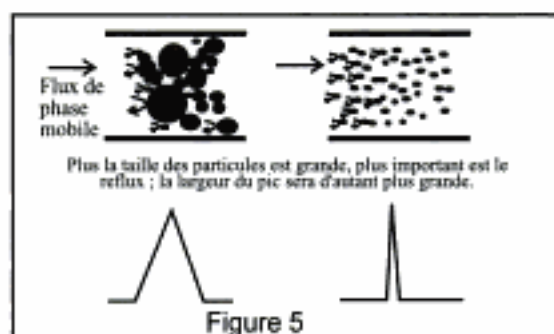
## 2. Etude cinétique

La théorie des plateaux, permettant d'arriver à des conclusions expérimentalement vérifiées, néglige cependant le fait que la chromatographie soit un phénomène dynamique. La vitesse de passage de la phase mobile  $\phi_M$  sur la phase stationnaire  $\phi_s$  entraîne un élargissement ou un rétrécissement des pics inexplicable par la théorie des plateaux.

Il faut donc éviter les phénomènes de diffusion se traduisant par un élargissement du pic. La modélisation est basée sur la loi de van Deemter (initialement proposée pour la chromatographie en phase gazeuse).

$$\text{HETP} = A + B / v + C \cdot v$$

( $v$  est la vitesse linéaire de progression de la phase mobile  $\phi_M$  dans la colonne).  
A, B et C sont des paramètres précisés ci-dessous.

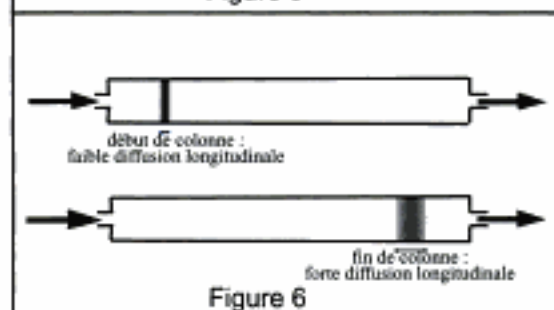


A est un facteur en rapport avec la **diffusion turbulente** : celle-ci est due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile sur la phase stationnaire constituée de particules (voir figure 5).

$$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$$

avec  $\lambda$  : régularité de la taille des grains  
 $d_p$  : diamètre des particules.

En HPLC, les grains sont de petits diamètres et de très grande régularité de taille.



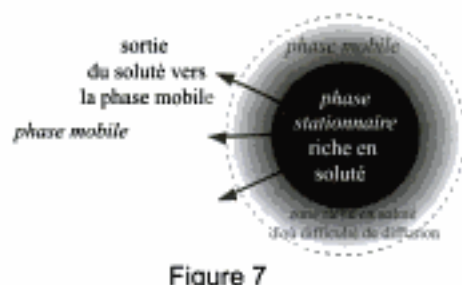
B est un terme en rapport avec la **diffusion longitudinale**.

Ce phénomène est inévitable : il se produit même en l'absence de grains de phase stationnaire (voir figure 6). Il est d'autant plus important que la vitesse d'écoulement est faible (d'où le terme  $B/v$ ).

$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_M$$

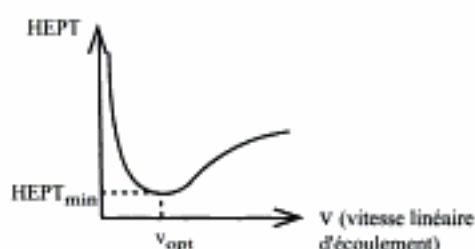
avec  $\gamma$  : facteur de tortuosité

$D_M$  : diffusivité de l'échantillon dans la phase mobile.



C est un terme en rapport avec les difficultés de passage d'un soluté d'une phase à l'autre (figure 7). Il est appelé "**résistance au transfert de masse**". La résistance la plus importante est le transfert de soluté de la phase stationnaire à la phase mobile (solubilisation dans la phase mobile).

C est fonction d'un "facteur de sélectivité", de l'épaisseur d'un film fictif autour de la phase stationnaire et de la diffusivité de l'échantillon dans la phase mobile.



La courbe  $\text{HEPT} = f(v)$  (voir figure 8) montre qu'il existe une vitesse linéaire de déplacement de la phase mobile pour laquelle la hauteur équivalente d'un plateau théorique (HETP) est la plus faible. Il s'agit donc de la vitesse la plus favorable pour le processus chromatographique.

## Schématisation des interactions entre solutés et phase stationnaire dans les principales méthodes chromatographiques classiques

|                         | ADSORPTION                                                                                                                                              | PARTAGE                                                                                                                                                  | ECHANGE D'IONS                                                                                                                                                           | EXCLUSION DIFFUSION                                                                                                                     | INTERACTIONS HYDROPHOBES                                                                                                   | INTERACTIONS BIOSPECIFIQUES                                                                                        |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nature des interactions | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Liaisons électrostatiques</i> entre groupements polaires</li> <li>- <i>Liaisons non polaires</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Solubilisation des solutés dans la phase stationnaire liquide</li> </ul>                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Liaisons ioniques</i> entre la phase stationnaire et les solutés</li> </ul>                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Pas d'interactions</i> : diffusion plus ou moins grande dans une matrice poreuse</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Liaisons hydrophobes</i> entre la phase stationnaire et les solutés</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Liaisons biospécifiques</i> entre un ligand et une protéine</li> </ul> |
| Schéma                  |                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                         |                                                                                                                            |                                                                                                                    |
|                         |                                                                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Phase stationnaire (solide)</li> <li>Phase mobile (liquide ou gazeuse) contenant les solutés à séparer</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Support Phase stationnaire solide (liquide) contenant les solutés à séparer</li> <li>Phase mobile (liquide ou gazeuse)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Phase stationnaire (balles avec greffage)</li> <li>Phase mobile</li> </ul>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Phase stationnaire (balles avec greffage)</li> <li>Phase mobile</li> </ul>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Phase stationnaire (balles avec greffage)</li> <li>Phase mobile</li> </ul>  |
| Applications            | Voir tableaux pages suivantes                                                                                                                           |                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                         |                                                                                                                            |                                                                                                                    |

## Diverses classifications des chromatographies

| <p>Classification selon la nature physique de la phase mobile</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <p>Classification selon la manière dont est immobilisée la phase stationnaire</p>                                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Classification selon la manière dont les solutés sont retenus dans la phase stationnaire</p>                                                                                                                                                                                                                                                              | <p>Classification selon le type d'interactions entre solutés et phase stationnaire</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Phase mobile liquide</p> <p>Phase mobile gazeuse</p> <p>Chromatographies</p> <p>en phase liquide (CPL) (sur colonne)</p> <p>en phase gazeuse (CPG) (sur colonne)</p> <p>chromato. de surface</p> <p>chromato. sur colonne basse pression</p> <p>chromato. d'adsorption</p> <p>chromato. de partage</p> <p>Chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC)</p> | <p>Chromatographies</p> <p>sur colonne</p> <p>de surface</p> <p>La phase stationnaire est immobilisée dans une colonne.</p> <p>La phase stationnaire constitue une surface plane.</p> <p>chromato. sur papier</p> <p>chromato. de partage</p> <p>chromato. sur couche mince</p> <p>chromato. sur papier</p> <p>chromato. de partage</p> <p>CPL</p> <p>CPG</p> | <p>Chromatographies</p> <p>par élution</p> <p>Le soluté reste dans la phase stationnaire.</p> <p>Le soluté sort de la phase stationnaire.</p> <p>chromato. de surface</p> <p>sur papier</p> <p>chromato. de partage</p> <p>sur couche mince</p> <p>chromato. d'adsorption</p> <p>chromato. de partage</p> <p>chromato. sur colonne</p> <p>CPL</p> <p>CPG</p> | <p><b>Adsorption</b></p> <p>Liaisons électrostatiques entre groupements polaires.<br/>Liaisons non polaires.</p> <p><b>Partage</b></p> <p>Solubilisation des solutés dans la phase stationnaire liquide.</p> <p><b>Echange d'ions</b></p> <p>Liaisons ioniques entre la phase stationnaire chargée et les solutés chargés (charge opposée).</p> <p><b>Exclusion - diffusion (gel-filtration)</b></p> <p>Absence d'interactions : diffusion plus ou moins grande dans une matrice poreuse.</p> <p><b>Interactions biospécifiques</b></p> <p>Liaisons biospécifiques entre un ligand et une protéine.</p> <p><b>Interactions hydrophobes</b></p> <p>Liaisons hydrophobes entre la phase stationnaire et les solutés.</p> |

Hidden page

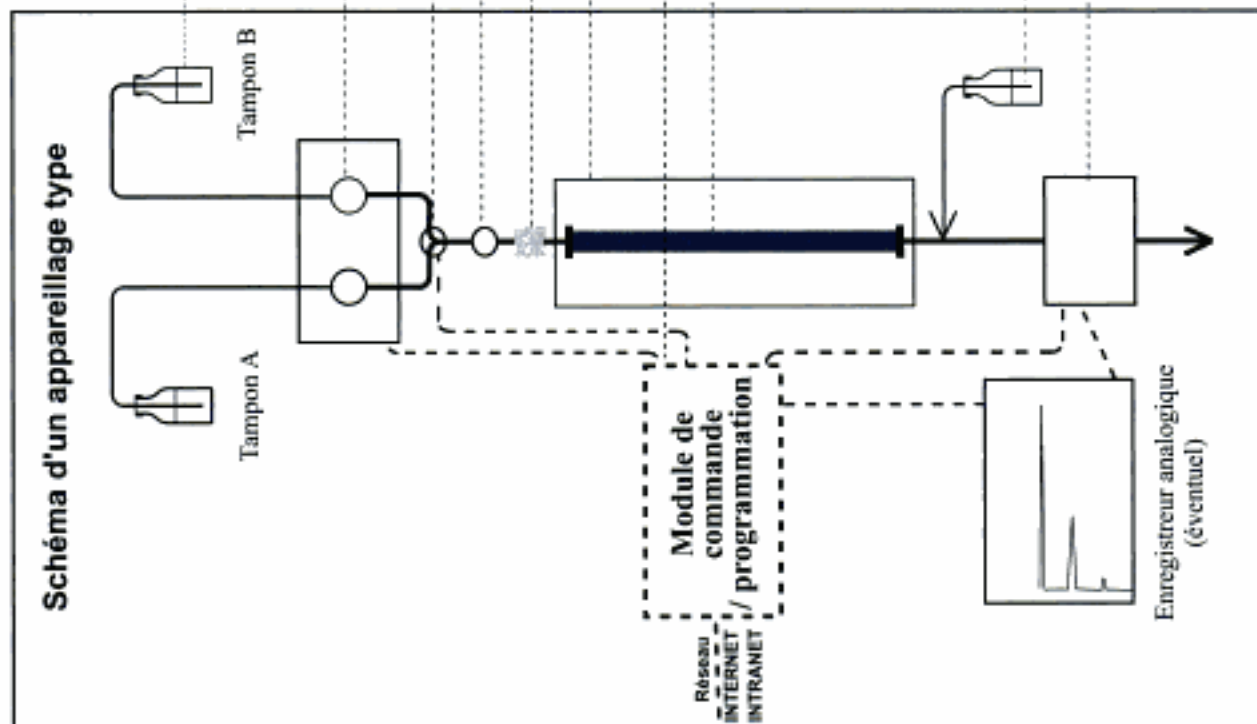
Hidden page

## Chromatographie liquide haute performance (CLHP) ("High Performance Liquid Chromatography" ou HPLC)

### Rôle

- **Phase liquide**
  - \* phase A (tampon A) : phase dans laquelle sont solubilisés les solutés à séparer ; permet la fixation des solutés sur la phase stationnaire ;
  - \* phase B (tampon B) : phase réalisant l'élan différentielle des solutés à séparer.
- **Pompes**
  - \* fournit la pression nécessaire à l'écoulement de la phase mobile au débit souhaité ;
  - \* débits de phase A et de phase B ajustés (selon ordres du programmeur de gradient) de manière à obtenir le gradient souhaité.
- **Mélangeur de la phase A et de la phase B**
- **Injecteur**
  - \* permet l'introduction de l'échantillon à analyser.
- **Précolonne**
  - \* colonne permettant de retenir d'éventuelles particules susceptibles de colmater (boucher) la colonne principale (rôle protecteur).
- **Colonne**
  - \* contient la phase stationnaire qui fixe les solutés ;
  - \* la phase stationnaire doit être adaptée au type de solutés à séparer.
- **Module de commande / programmation**
  - \* initialise et teste les diverses parties de l'appareillage (pompes, détecteur, enregistreur, ...)
  - \* entrée des paramètres à utiliser pour la séparation ;
  - \* commande en ligne des pompes (débit, gradient, mélangeur), détecteur et enregistreur ;
  - \* enregistrement numérique et traitement des données (identification des pics, mesure de surface et éventuellement, détermination de la quantité de substance) ;
  - \* connexion avec des banques de données via INTRANET et/ ou INTERNET.
- **Détecteur**
  - \* met en évidence les solutés élués grâce à une de leurs propriétés physiques :
    - absorption moléculaire, particulièrement dans l'UV ;
    - émission moléculaire ;
    - indice de réfraction (sucres, acides organiques) ;
    - oxydoréduction ;
  - \* détection éventuellement après dérivation (séparation des acides aminés, ...)

### Schéma d'un appareillage type



### Descriptif des diverses parties

#### - Réservoirs de phases mobiles (ici deux tampons)

Phases mobiles filtrées (porosité de 0,44  $\mu\text{m}$ ) et dégazées

#### - Pompes (haute pression : 200 atm max soit 20 MPa)

#### - Mélangeur

#### - Injecteur

Précolonne

Enceinte thermostatée

#### - Module de commande / programmation

#### - Colonne (éventuellement dans une enceinte thermostatée) :

- lit fixe ;
- billes de faible diamètre (quelques  $\mu\text{m}$ , d'où fortes pertes de charges et nécessité de travailler à pression élevée), mais très grande surface de contact ;
- diamètres des billes aussi homogènes que possible.

#### - Réactif éventuel (dérivation post colonne) ; peut également être introduit en pré-colonne.

#### - Détecteur

- \* UV (absorption moléculaire) ;
  - \* fluorescence (émission moléculaire) ;
  - \* réfractométrie (sucres, acides organiques) ;
  - \* électrochimie.
- Collecteur de fractions (plués à l'échelle préparative) ; dispositif transposable à l'échelle industrielle.

Hidden page



## 1. Chromatographie par gel-filtration

1.1. Le degré de réticulation de la phase stationnaire doit-il être faible ou élevé ? Justifier la réponse.

1.2. Lors de la réalisation de la séparation, on note un chevauchement des pics chromatographiques, traduisant par là une résolution plutôt médiocre. Sachant qu'en gel-filtration, il est difficile d'améliorer le facteur de sélectivité et le facteur de capacité, comment serait-il néanmoins possible d'améliorer cette résolution ?

Rappels :

- *facteur de sélectivité* : il représente la différence de comportement des molécules à étudier ; il est lié dans ce type de chromatographie à leur taille, à la porosité et à l'uniformité de la phase stationnaire. Les faibles différences de taille des molécules à séparer sont pratiquement compensées par la variabilité des pores ;

- *facteur de capacité* : il est faible dans ce type de chromatographie.  $K$  est voisin de 1 et le rapport  $v_S / v_M$  ne peut varier beaucoup puisque le gel est choisi en fonction des masses molaires des molécules à séparer ;

## 2. Chromatographie RP-HPLC

2.1. Que signifie le sigle RP-HPLC ? En quoi consiste une colonne  $C_{18}$  ?

2.2. Quel est le principe de la séparation effectuée ? L'ordre de sortie des peptides VIIa et VIIb est-il conforme à ce principe ?

2.3. En admettant que le volume de phase mobile occupe 70 % du volume intérieur de la colonne (diamètre = 1,8 cm, longueur = 30 cm), calculer le volume mort théorique ( $v_0$ ) et le temps mort correspondant ( $t_0$ ). Calculer également le facteur de sélectivité, le facteur de capacité et la résolution obtenue. Conclure quant à la qualité de l'analyse effectuée, sachant que l'on souhaite un facteur de capacité compris entre 2 et 10, un facteur de sélectivité et une résolution supérieurs à 1.

Données :

- séquence des peptides :

- VIIa Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe

- VIIb Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe

- conditions chromatographiques :

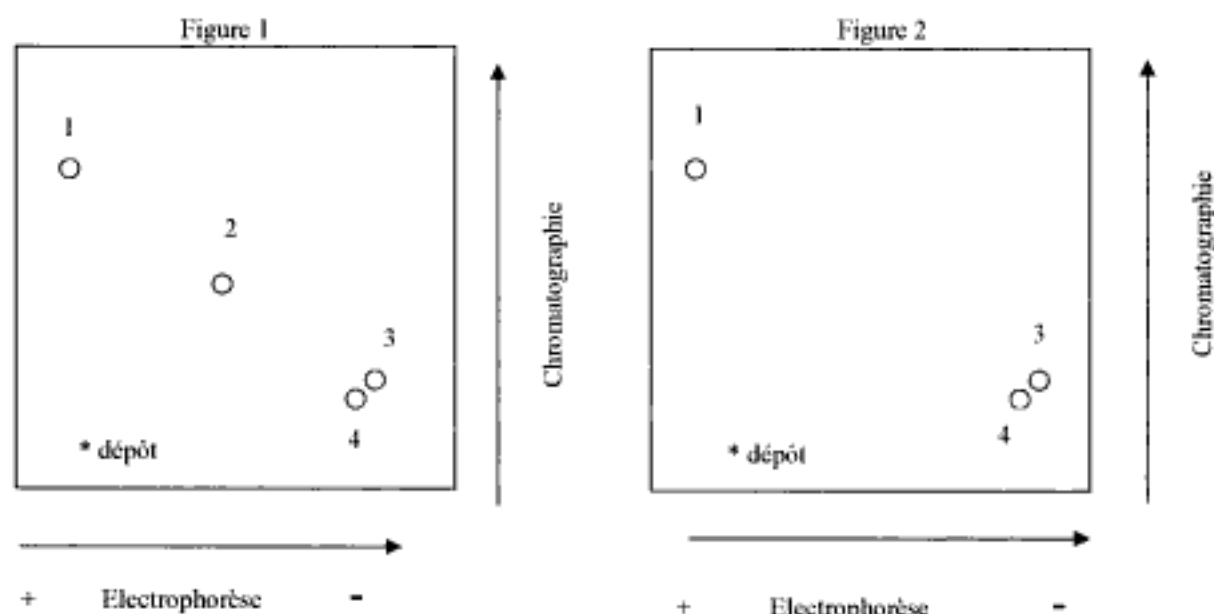
- gel-filtration ; élution isocratique par un tampon acétate d'ammonium  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH = 6, débit de  $6 \text{ mL.min}^{-1}$

- RP-HPLC ; éluant A identique à l'éluant précédent et éluant B (acétonitrile pur). On réalise un gradient linéaire de 0 à 40% de B en 40 minutes. Le débit est de  $12 \text{ mL.min}^{-1}$ .

**Exercice 3 Electrochromatographie**

Un échantillon comprenant des acides aminés et un dipeptide est soumis à une électrochromatographie sur papier avant et après hydrolyse trypsique (électrophorèse à pH = 6,4 suivie d'une chromatographie ascendante avec le solvant classique : n-butanol, acide acétique, eau : 4, 1, 5).

Les résultats sont présentés sur les figures 1 (avant hydrolyse) et 2 (après hydrolyse).

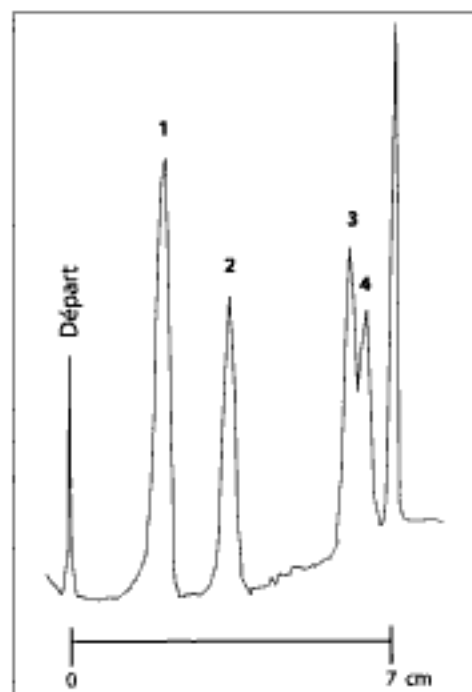


Après révélation à la ninhydrine, tous les spots sont colorés en mauve. Les constituants 1 et 2 peuvent également être révélés par des réactifs de la fonction phénol et le composé 3 par le réactif de Sakaguchi.

1. Identifier les composés 1, 3 et 4 en tirant partie des révélations effectuées par les différents réactifs utilisés et de considérations à partir des principes de l'électrophorèse et de la chromatographie.

2. Après hydrolyse trypsique, on retrouve les composés 1, 3 et 4, mais le composé 2 a disparu (comparer les figures 1 et 2). Est-il possible d'identifier le composé 2 ?

3. L'échantillon à analyser est déposé sur une colonne de résine échangeuse d'ions portant des groupements -COOH. La résine est équilibrée à pH = 6. L'élution est effectuée par un gradient ascendant de pH. Quels sont les résultats prévisibles de cette chromatographie ?

**Exercice 4** Séparation d'éléments nucléiques par CCM

Composition du mélange à analyser :

300 ng de chacun des composés suivants :

| Numéro du pic | 1       | 2         | 3     | 4   |
|---------------|---------|-----------|-------|-----|
| Composé       | adénine | adénosine | c-AMP | AMP |

La chromatographie est effectuée dans une cuve normale avec saturation de cuve. Le solvant est un mélange eau-acétonitrile 80/20 (v/v). La distance de migration est de 7 cm et la détection s'effectue en UV à 254 nm à l'aide d'un scanner CCM.

Le résultat obtenu se trouve sur la figure ci-contre.

Quelle peut-être la nature de la phase stationnaire et quel est le principe de base de la séparation effectuée ?

La plaque de CCM présentant un marquage fluorescent, comment s'effectue la détection des composés ? Celle-ci peut-elle être quantitative ?

**Exercice 5** Etude d'une activité lipasique par HPLC

L'activité enzymatique d'un extrait E est étudiée vis-à-vis d'un triglycéride, la trioléine émulsifiée. Le volume final du milieu réactionnel enzymatique est de 0,5 mL.

Dans un microtube, on introduit de la trioléine, de la gomme arabique à 1 % et un tampon phosphate, pH = 6. Ce milieu est agité et incubé pendant 10 minutes à + 30°C.

100 µL de l'extrait E sont alors ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant 20 min après agitation. On ajoute alors 1 mL de mélange chloroforme-méthanol (1 / 1, v/v) et après 2 min d'agitation au vortex, on centrifuge pendant 2 min à 12000 g.

20 µL de phase organique sont alors prélevés et injectés dans une colonne HPLC constituée de silice greffée en C<sub>18</sub>. Le suivi de l'éluion, en mode isocratique, est effectué par spectrophotométrie à 208 nm. Le chromatogramme obtenu fait apparaître 4 pics, dont l'un est attribuable à 0,6 µmol d'acide oléique.

1. Sur quel principe est basée la détermination de l'activité enzymatique ? Quel est le rôle joué par la gomme arabique ? Quels sont les deux rôles joués par le mélange chloroforme-méthanol ?

2. Calculer la CAC de l'extrait E dans des unités à définir (on estimera que le volume total de phase organique est de 500 µL).

3. Quel est le principe de la séparation chromatographique ? Comment est-il possible d'identifier et de quantifier l'acide oléique apparu suite à l'action de l'enzyme ?

4. A quoi peuvent correspondre les 3 autres pics observés ? Dans quel ordre sont-ils élués ? Justifier la réponse.

**Exercice 6** Evaluation de la fraîcheur du poisson par dosage de l'histamine

L'histamine est le produit de décarboxylation de l'histidine. Elle est responsable de troubles plus ou moins graves avec des symptômes ressemblant à ceux d'une allergie. Le seuil de tolérance chez les sujets sensibles est de 10 mg d'histamine pour 100 g de poisson.

On se propose de doser l'histamine par HPLC.

1. La phase stationnaire est une colonne Kromasil® 5 µm, C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm. Sur quel principe de séparation est basée cette chromatographie ?

2. L'éluion est réalisée en gradient binaire eau-acétonitrile, le pourcentage d'acétonitrile augmentant en fonction du temps. Le document 1 donne un profil d'éluion obtenu à la suite de l'injection d'un mélange d'histamine et d'autres amines biogènes ; il précise également les conditions de la chromatographie.

Justifier l'ordre d'éluion pour la putrescine et la cadavérine.

Données : structure de la cadavérine H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> et de la putrescine H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>.

3. La méthode de dosage utilise un étalon externe. Quelle en est la méthodologie et quel est son principal inconvénient ?

4. La préparation des échantillons avant injection, nécessite :

- une extraction ;
- une dérivation précolonne par le chlorure de dansyle ;
- la récupération du dérivé dansylé.

Ces étapes préparatives sont présentées sur le document 2. Le contrôle du rendement de ces étapes préparatives nécessite la réalisation d'échantillons supplémentés en histamine à 50 et 100  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

4.1. Quel est l'intérêt de la dansylation de l'histamine ?

4.2. Calculer la concentration en histamine dans les échantillons injectés en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (consulter à cet effet le document 3).

4.3. Calculer la masse d'histamine en  $\text{mg.kg}^{-1}$  d'échantillon supplémenté sachant que la masse volumique de l'échantillon broyé est de  $1 \text{ g.mL}^{-1}$  (consulter les documents 1 et 2).

4.4. Déterminer le rendement pour chaque échantillon supplémenté. Conclure.

### Document 1 : Conditions chromatographiques

Colonne : Kromasil<sup>®</sup> 5  $\mu\text{m}$ , C 18, 250 x 4,6 mm.

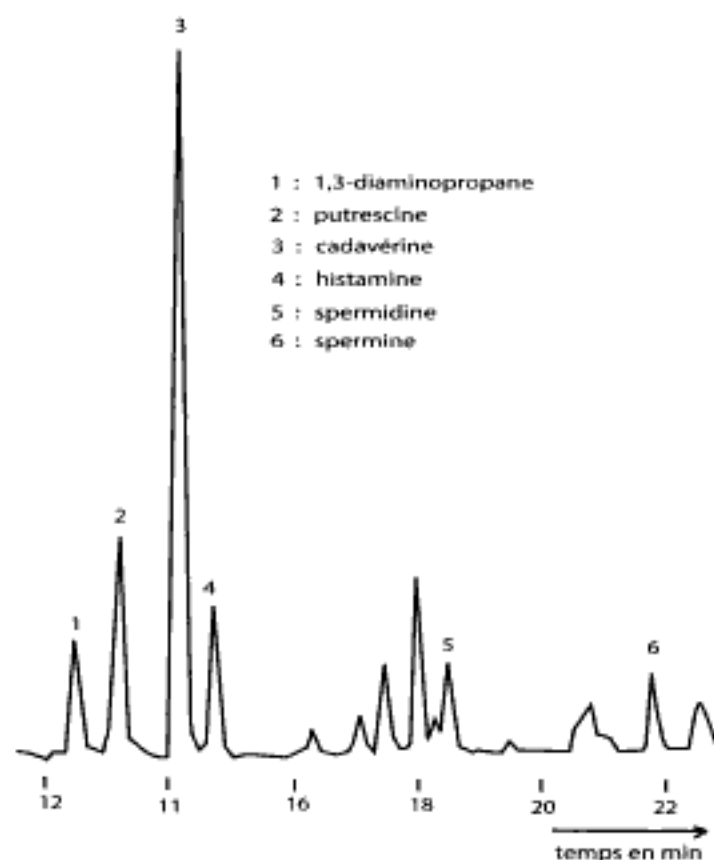
Phase mobile : gradient binaire eau - acétonitrile

Débit : 1  $\text{mL.min}^{-1}$

Pression : 90 bars.

Détection UV à 254 nm des dérivés dansylés des amines.

Volume injecté : 20  $\mu\text{L}$ .



**Document 2 :****Notion d'échantillons supplémentés ou méthode des ajouts dosés**

Cette méthode consiste à ajouter une quantité connue d'un constituant à doser, ici l'histamine, à un milieu supposé en contenir, puis à doser la solution ainsi obtenue.

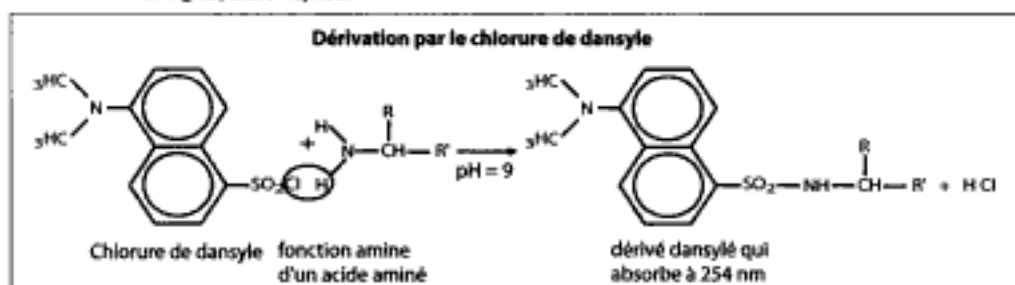
**Etapes préparatives****1<sup>o</sup> étape : extraction**

|                                                                                        |                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Echantillon supplémenté à 50 mg.kg <sup>-1</sup>                                       | Echantillon supplémenté à 100 mg.kg <sup>-1</sup>                              |
| Peser 5 g d'échantillon préalablement broyé exempt d'histamine après contrôle par CCM. |                                                                                |
| Ajouter 2,5 mL d'une solution d'histamine à 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> .                  | Ajouter 0,5 mL d'une solution d'histamine à 1 mg.mL <sup>-1</sup> .            |
| Ajouter 7,5 mL d'une solution d'acide perchlorique à 0,2 mol.L <sup>-1</sup> .         | Ajouter 9,5 mL d'une solution d'acide perchlorique à 0,2 mol.L <sup>-1</sup> . |
| Homogénéiser.                                                                          |                                                                                |
| Centrifuger à 2500 g pendant 20 minutes à 2 °C.                                        |                                                                                |

**2<sup>o</sup> étape : dérivation par le chlorure de dansyle**

Prélever 100 µL de surnageant et ajouter :

- 40 µL de solution de 1,3-diamino propane à 25 µg.mL<sup>-1</sup> (contrôle de la reproductibilité des temps de rétention)
- 200 µL de carbonate de sodium saturé (neutralisation de l'acide perchlorique)
- 400 µL de chlorure de dansyle
- Agiter, boucher et placer dans un bain thermostaté à 60°C.
- Ajouter 100 µL de solution de proline (pour neutraliser l'excès de chlorure de dansyle).
- Agiter, laisser reposer.

**3<sup>o</sup> étape : récupération du dérivé dansylé**

- Ajouter 500 µL de toluène.
- Agiter vigoureusement et laisser décanter.
- Transvaser la phase organique.
- Evaporer le toluène sous azote.
- Reprendre le résidu sec par 300 µL d'acétonitrile et filtrer sur filtre 0,2 µm.

**Document 3 : Etalonnage externe et échantillons supplémentés****Etalonnage externe**

| Concentration Y | 5      | 10     | 25      | 50      | 75      | 100     |
|-----------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Aire du pic X   | 34 872 | 74 619 | 170 562 | 373 331 | 510 794 | 716 989 |

Equation de la régression linéaire :  $Y = aX + b$      $a =$      $b =$      $r =$   
 $a$  = coefficient directeur de la droite  
 $b$  = ordonnée à l'origine  
 $Y$  = concentration (µg . mL<sup>-1</sup>)  
 $X$  = aire des pics en unités arbitraires  
 $r$  = coefficient de corrélation

**Echantillons supplémentés :**

|                           |                          |                           |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Echantillon supplémenté à | 50 mg . kg <sup>-1</sup> | 100 mg . kg <sup>-1</sup> |
| Aire du pic               | 26 975                   | 54 660                    |

Hidden page

1. Quels sont les différents temps de l'expérience chromatographique ?
2. Proposer une représentation graphique rendant compte de l'élué, la commenter.
3. Déterminer le volume de rétention pour A et pour B.
4. Calculer le pourcentage total de peptides récupérés.
5. Evaluer les pourcentages relatifs des deux constituants en admettant que le rendement de la colonne soit le même pour A et pour B.

### Exercice 9 Rendement d'une chromatographie pour une molécule sans interaction avec la phase stationnaire

0,5 mL d'un mélange aqueux de proline ( $pH_i = 6,30$ ) et d'acide glutamique ( $pH_i = 3,22$ ) sont introduits en tête d'une colonne contenant de la résine Amberlite IRA 120 porteuse de groupements  $-N^+=(CH_3)_3 Cl^-$ .

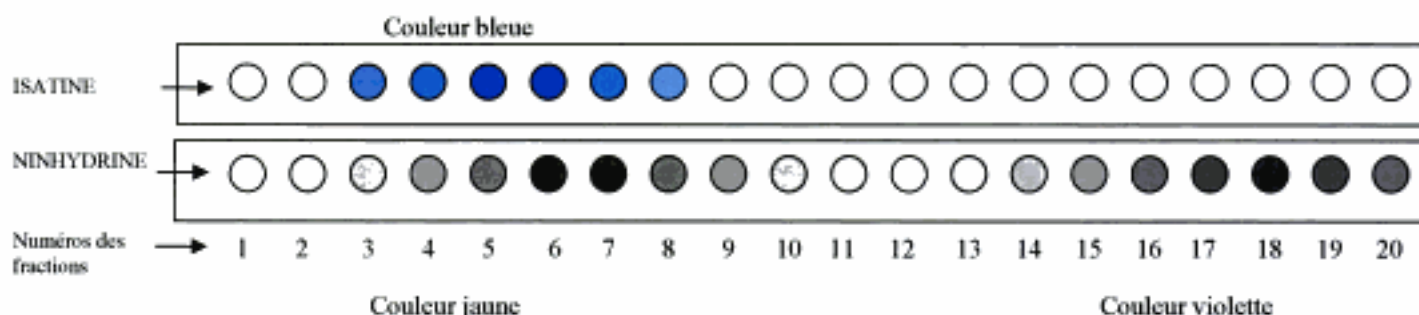
La colonne est alors percolée par 15 mL de tampon phosphate à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $pH = 6,15$ . Dix fractions de 1,5 mL sont recueillies et notées de 1 à 10.

La colonne est ensuite percolée par 15 mL de tampon citrate à  $0,135 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $pH = 3,5$ . Dix fractions de 1,5 mL sont recueillies et notées de 11 à 20.

1. Analyse qualitative des différentes fractions.

Sur deux bandes de papier Whatman n° 1, une goutte de chacune des fractions (de 1 à 20) est déposée sur chaque bande. La première bande est révélée par le réactif à l'isatine caractéristique de la proline, la seconde par le réactif à la ninhydrine.

L'aspect des deux bandes est le suivant :



Justifier les résultats obtenus.

2. Analyse quantitative de la récupération de la proline.

Le contenu des tubes renfermant de la proline est rassemblé dans une fiole jaugée de 50 mL. Le volume est complété à 50 mL avec de l'eau distillée (tubes P).

Le mélange initial est dilué au 1/100 (tubes \* M \*).

On réalise également un étalonnage à partir d'une solution de proline à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  dans HCl à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (tubes \* G \*).

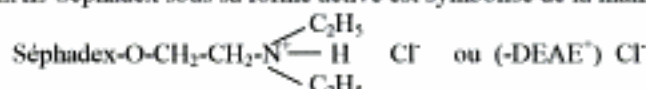
L'ensemble des opérations de dosage figure dans le tableau ci-dessous :

|                                        | T     | G1    | G2    | G3    | G4    | M1    | M2    | P1    | P2    |
|----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Solution étalon de proline en mL       | 0,0   | 0,1   | 0,2   | 0,3   | 0,4   |       |       |       |       |
| Mélange initial dilué au 1 / 100 en mL |       |       |       |       |       | 0,3   | 0,3   |       |       |
| Contenu de la fiole de 50 mL en mL     |       |       |       |       |       |       |       | 0,3   | 0,3   |
| Eau distillée en mL                    | 1,0   | 0,9   | 0,8   | 0,7   | 0,6   | 0,7   | 0,7   | 0,7   | 0,7   |
| Acide acétique RP en mL                | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   |
| Réactif à la ninhydrine en mL          | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   |
| Absorbance lue à 515 nm                | 0,000 | 0,065 | 0,132 | 0,200 | 0,268 | 0,139 | 0,149 | 0,130 | 0,140 |

Calculer la concentration en proline dans le mélange initial, ainsi que dans la fiole jaugée de 50 mL. En déduire le pourcentage de récupération de la proline, composé sans interaction avec la phase stationnaire de la chromatographie.

### Exercice 10 Séparation de bases puriques, pyrimidiques et de nucléosides phosphate

Cette séparation s'effectue aisément sur une colonne d'échangeurs d'ions de type DEAE-Séphadex. Ce dernier s'obtient par introduction de groupements fonctionnels diéthylaminoéthyl (DEAE) sur des unités glucose du dextrane réticulé constituant le Séphadex. Le DEAE-Séphadex sous sa forme active est symbolisé de la manière suivante :



L'élué des composés retenus sur l'échangeur s'effectue, soit par un gradient de pH, soit, comme ici, par un gradient de force ionique (mélange hydrogencarbonate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  et carbamate d'ammonium  $\text{NH}_2\text{COONH}_4$ ).

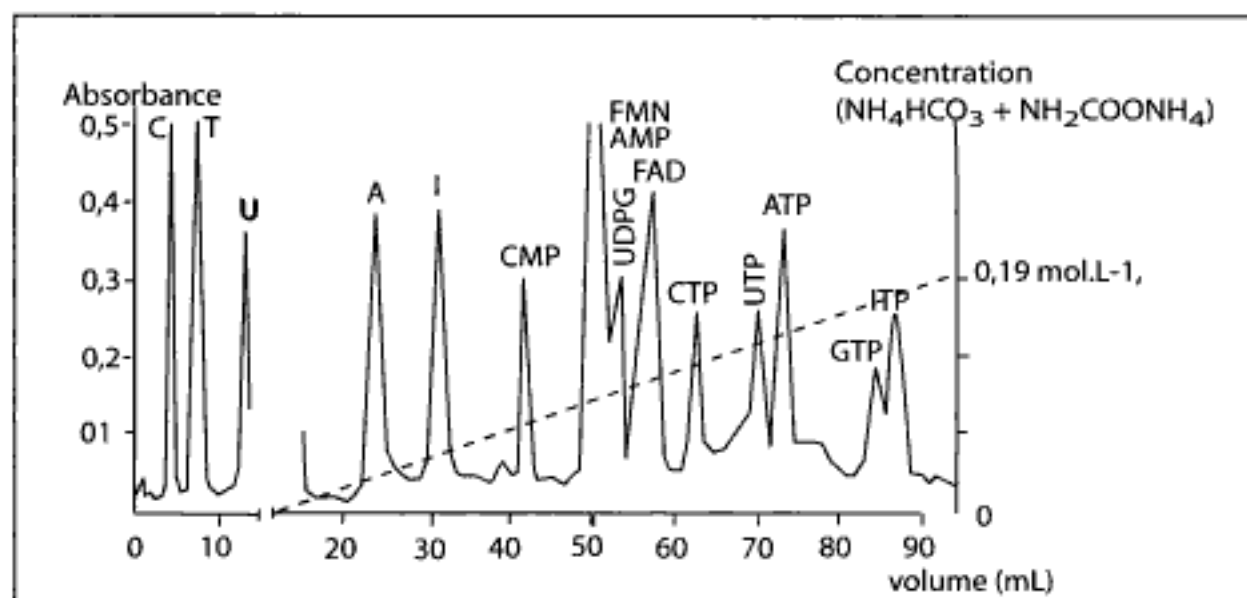
Le diagramme d'élué obtenu à partir du mélange à analyser est reproduit sur la figure ci-dessous.

1. Le DEAE-Séphadex est-il un échangeur d'anions ou de cations ? Justifier la réponse.
2. Outre leur réaction d'échange, les groupements -DEAE<sup>+</sup> peuvent donner lieu à un équilibre acido-basique. Ecrire cet équilibre.
3. En utilisant l'équation de Henderson-Hasselbalch :  $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{acide}]}$ , déterminer le % de groupements DEAE chargés positivement aux pH suivants : 3 - 7 - 9,5 et 11.  
Donnée : le  $\text{pK}_a$  du groupement DEAE est égal à 9,5.

Remarque : le % demandé revient à calculer le rapport :  $\frac{100 \cdot [-\text{DEAE}^+]}{[-\text{DEAE}^+] + [-\text{DEAE}]}$ .

En déduire la contrainte exercée par le pH au niveau de l'utilisation de l'échangeur.

4. Commenter le diagramme d'éluion obtenu. Donner en particulier des précisions sur :
  - l'ordre de sortie des différentes catégories de composés ;
  - l'ordre de grandeur du pH d'utilisation de l'échangeur ;
  - la longueur d'onde à laquelle s'effectue la mesure de l'absorbance.

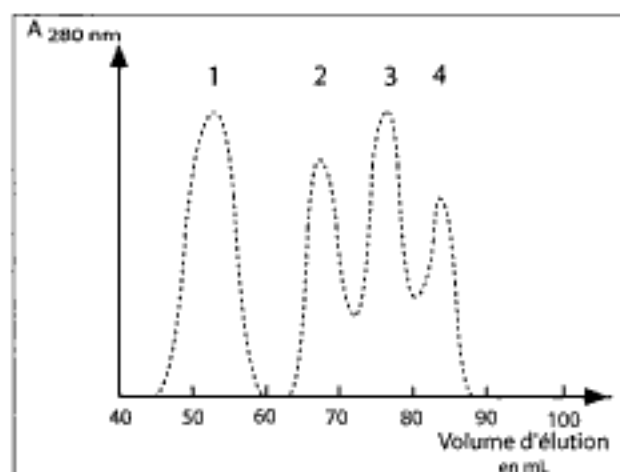


### Exercice 11 Détermination de la masse molaire moléculaire d'une protéase

On veut déterminer la masse molaire moléculaire d'une protéase que l'on vient de purifier par diverses méthodes chromatographiques (échange d'ions, puis gel-filtration et interaction biospécifiques).

A cet effet, on utilise une technique de gel-filtration sur Sephadex G150, dont le domaine de séparation se situe pour les protéines de 4000 et 150000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . On dispose des marqueurs de masse molaire suivants : lactate déshydrogénase (LDH), phosphatase alcaline (PAL) et ovalbumine. Les masses molaires de ces marqueurs sont respectivement de 135000, 80000 et 45000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

On décide d'effectuer la détermination de la masse molaire moléculaire en une seule étape chromatographique en présence des 3 marqueurs et de la protéase. Le profil d'éluion obtenu est indiqué dans le schéma suivant :



Sachant que la masse molaire moléculaire de la protéase est comprise entre les valeurs extrêmes des marqueurs, c'est-à-dire entre 45000 et 135000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , comment peut-on exploiter au mieux les résultats obtenus sans expérimentation complémentaire ?

Quelle est la masse molaire moléculaire de la protéase purifiée ?

Hidden page



2. L'étude en phase gazeuse de la glycoprotéine native perméthylée, hydrolysée et trifluoroacétylée permet d'identifier le 2,3,6-tri-O-méthyl c et le 2,6-di-O-méthyl b, dans un rapport quantitatif 2/1. La glycoprotéine réduite, perméthylée et traitée comme précédemment, permet d'identifier en plus le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl c. De plus, c et d sont des anomères de type  $\alpha$ , tandis que b est de type  $\beta$ .

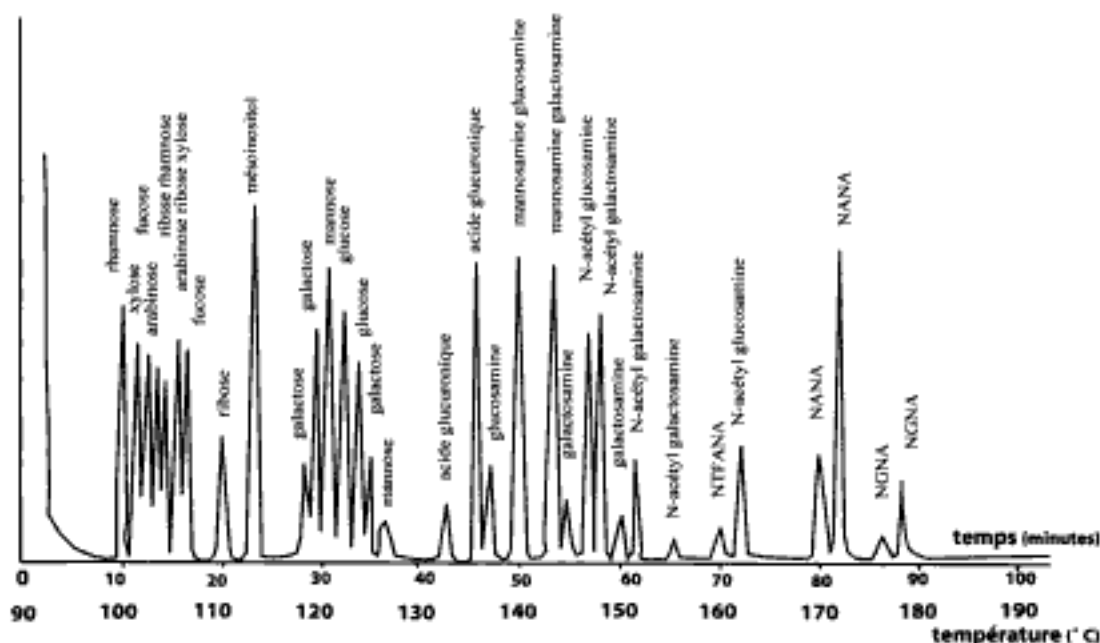
Donner la structure de la copule glucidique répétitive, structure qui est du type -c-b-c- (on ne se préoccupe pas du monosaccharide a, présent en faible quantité).

d

3. La CPG est considérée comme une chromatographie dotée d'excellentes performances pour des molécules volatiles ou rendues telles. On souhaite la comparer au niveau performance à l'HPLC au niveau du couple phase stationnaire et phase mobile :

- à partir de l'expression donnant la HEPT en fonction de la vitesse linéaire d'éluion (voir cours), quel est l'avantage d'une CPG en colonne capillaire par rapport à une HPLC ?
- quel est, par contre, l'avantage de l'HPLC par rapport à la CPG, en raisonnant toujours au niveau du couple phase stationnaire et phase mobile ?

**Document 1 :** CPG de divers O-méthylglycosides trifluoroacétylés. Température initiale de la colonne : 90 °C, température finale 190 °C. Gradient de température de 1 °C par minute. Gaz vecteur : azote.  
NANA : acide N-acétylneuraminique ; NGNA : acide N-glycolylneuraminique ; NTFANA : acide N-trifluoroacétylneuraminique



**Document 2 :** Températures de rétention ( $\theta_R$  en °C) des isomères des oses ou dérivés d'oses soumis à la méthanolyse et trifluoroacétylés.

| Oses ou dérivés d'oses<br>(après méthanolyse et trifluoroacétylation). | $\theta_R$<br>(°C) | Oses ou dérivés d'oses<br>(après méthanolyse et trifluoroacétylation). | $\theta_R$<br>(°C) |       |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------|
| Rhamnose                                                               | 100,5              | Mannose                                                                | 121,5              |       |
|                                                                        | 195,0              |                                                                        | 127,0              |       |
| Arabinose                                                              | 104,0              | Glucose                                                                | 123,0              |       |
|                                                                        | 106,0              |                                                                        | 124,5              |       |
| Fucose                                                                 | 103,0              | Mannosamine                                                            | 140,0              |       |
|                                                                        | 103,2              |                                                                        | 143,5              |       |
|                                                                        | 107,0              | Glucosamine                                                            | 140,0              |       |
| 105,0                                                                  | 137,5              |                                                                        |                    |       |
| Ribose                                                                 | 106,0              | Galactosamine                                                          | 143,5              |       |
|                                                                        | 110,5              |                                                                        | 145,5              |       |
| Xylose                                                                 | 102,0              | N-acétylglucosamine                                                    | 147,0              |       |
|                                                                        | 106,0              |                                                                        | 162,0              |       |
| Mésoinositol                                                           | 114,0              | Acide N-acétylneuraminique                                             | 170,0              |       |
| Mannitol                                                               | 118,5              |                                                                        | 172,0              |       |
| Galactitol                                                             | 122,5              |                                                                        | Acide glucuronique | 133,0 |
| Sorbitol                                                               | 120,0              |                                                                        |                    | 137,5 |
| Galactose                                                              | 119,0              |                                                                        |                    |       |
|                                                                        | 120,0              |                                                                        |                    |       |
|                                                                        | 125,5              |                                                                        |                    |       |
| Acide galacturonique                                                   | 115,0              |                                                                        |                    |       |
|                                                                        | 119,0              |                                                                        |                    |       |

Hidden page

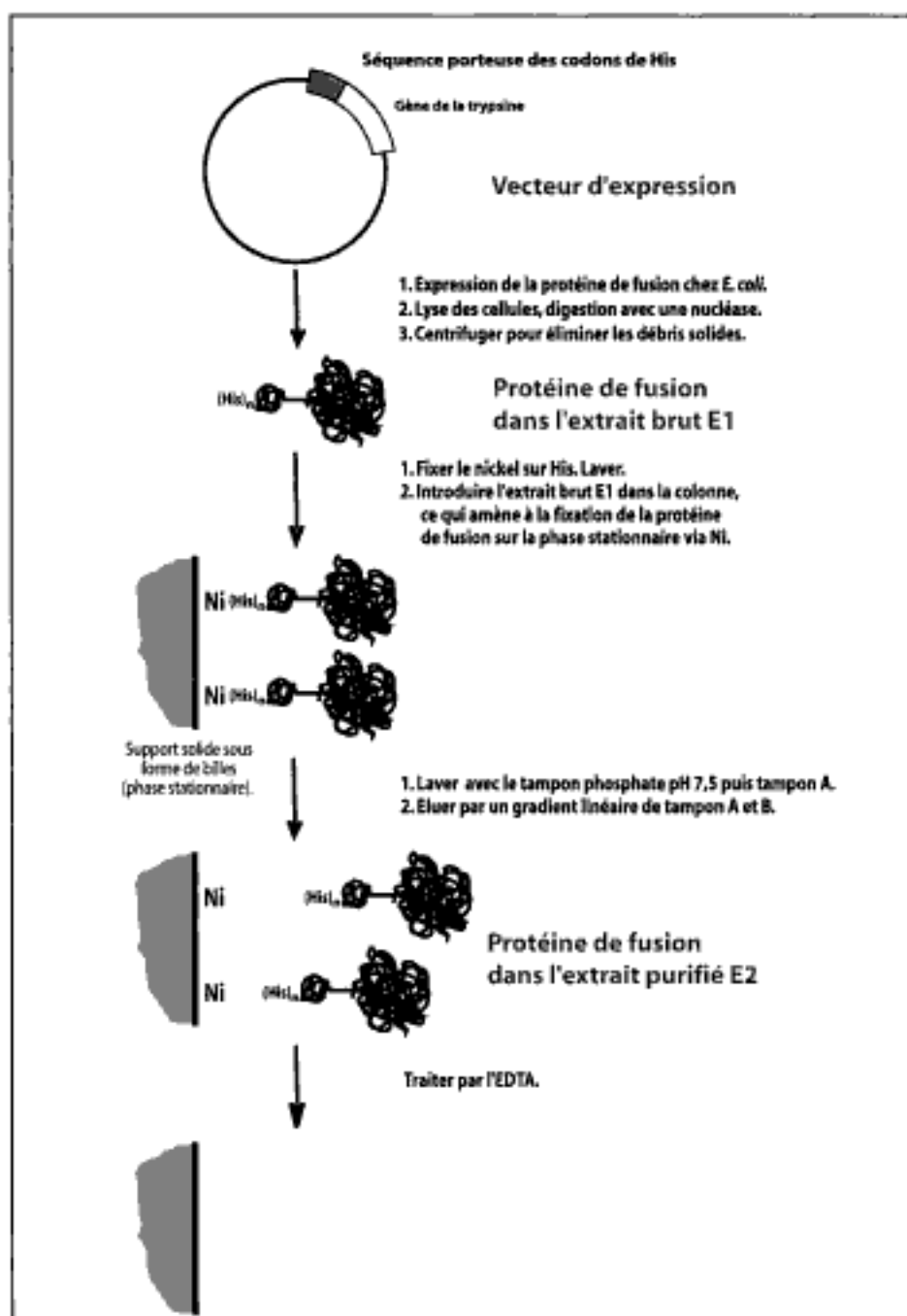
**Exercice 15** Purification d'une protéine de fusion, la trypsine

La voie du génie génétique pour la production de trypsine est actuellement préférée à la voie extractive. Le gène de la trypsine est isolé et on lui ajoute en amont un oligonucléotide constitué de 6 fois le codon correspondant à l'histidine.

L'ADN recombinant est inséré dans un vecteur plasmidique. Celui-ci est introduit par électroporation dans *Escherichia coli*. Après culture et sélection, un clone (UFC) recombinant est mis en culture.

Une lyse cellulaire permet d'obtenir, après centrifugation, un extrait brut, noté E1. Une partie de cet extrait brut est soumise à une purification chromatographique. On obtient un extrait purifié, noté E2.

L'ensemble du processus est schématisé sur le document 1.

**Document 1 : schéma du mode opératoire de purification de la protéine de fusion**

1. Sur quel principe est basée la purification chromatographique ? Comment s'effectue l'éluion de la trypsine ? Voir documents 2 et 3.
2. La détermination de la CAC de l'extrait E2 s'effectue selon le protocole figurant sur le document 4. La variation d'absorbance observée à 410 nm est de 0,070 par minute. Calculer la CAC de l'extrait E2.
3. Calculer l'enrichissement et le rendement, compte tenu des données figurant dans le document 5. Conclure.

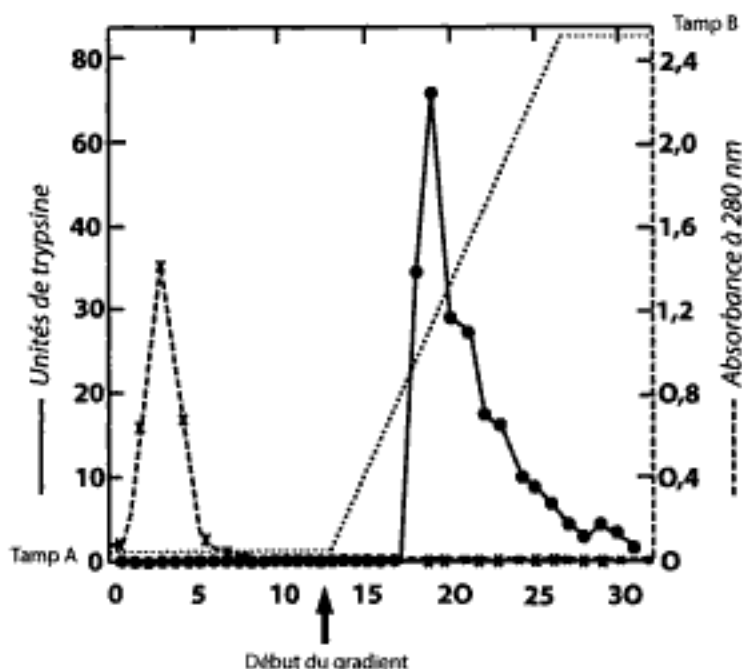
**Document 2 : description du mode opératoire de purification de la protéine de fusion**

Remplir la colonne avec la phase stationnaire (matrice de verre poreux sur laquelle est greffé de l'acide iminodiacétique par l'intermédiaire d'un bras hydrophile) en suspension dans NaCl à  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ . Percuter avec une solution de NaCl à  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$  (2 volumes de colonne, soit 2VC).

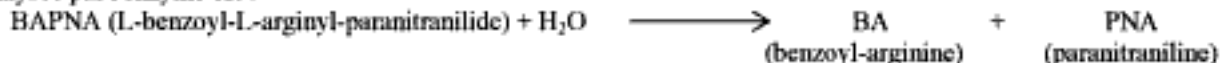
Charger la phase stationnaire avec le métal (1VC de  $\text{NiSO}_4$  à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 3$ ). Laver avec 5VC de tampon phosphate à  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ .

Injecter l'extrait E1 et éluier avec un tampon imidazole à  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ , phosphate à  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,5$  (tampon A), puis avec un gradient linéaire tampon A-tampon B (imidazole à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , phosphate à  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ). Le début de la mise en œuvre du gradient est indiqué sur le profil d'éluion par une flèche verticale.

La colonne est réutilisable après un traitement par l'EDTA à  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (2VC), puis par HCl à 0,3 %,  $\text{pH} = 1,5$  (2VC).

**Document 3 : profil d'éluion lors de la purification de la protéine de fusion****Document 4 : détermination de l'activité trypsique de la fraction E2**

- La réaction catalysée par l'enzyme est :



- PNA est jaune en milieu alcalin, ce qui permet un suivi cinétique de la réaction.

- L'extinction molaire à 410 nm de PNA est de  $880 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ .

- Le mode opératoire est le suivant :

|                                                                                                                                        |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Solution de BAPNA-DMSO dans un tampon Tris-HCl $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , $\text{pH} = 8,4$ , $\text{CaCl}_2$ $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ | 0,2 mL |
| Tampon Tris-HCl, $\text{pH} = 8,4$ , $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ , DMSO (diméthylsulfoxyde)                                               | 1,7 mL |
| Extrait E2 dilué au 1/1000                                                                                                             | 0,1 mL |

- On mesure le  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  à 410 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique.

**Document 5 : résultats de la purification**

| Extrait              | Volume fraction (mL) | CAC ( $\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | [protéines] en $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|----------------------|----------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| E1 : extrait brut    | 300                  | 43                                       | 3,8                                             |
| E2 : extrait purifié | 60                   |                                          | 0,2                                             |

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Performance des colonnes chromatographiques

1. Le temps de rétention (brut) d'un analyte est l'abscisse  $t_r$  du maximum du pic observé.
2. Calcul du nombre de plateaux théoriques  $N$  et des HEPT  
Connaissant la largeur à la mi-hauteur des pics, il convient d'utiliser la formule (donnée dans l'étude théorique de la chromatographie)

$$N = 5,54 \cdot (t_r / \delta)^2$$

$N$  étant un nombre sans dimension,  $t_r$  et  $\delta$  doivent être exprimés dans les mêmes unités, par exemple en s.

Pour le pic dans le cas de la colonne A,  $\delta = 1,6$  mm, soit  $1,6 / 10 = 0,16$  min ou  $0,16 \cdot 60 = 9,6$  s.

Pour le pic dans le cas de la colonne B, le même type de calcul donne  $\delta = 12,6$  s.

- colonne A :  $N = 5,54 \cdot (401 / 9,6)^2 = 9666$  plateaux théoriques et  $\text{HEPT} = L/N = 25 / 9666 = 0,00259$  cm ;

- colonne B :  $N = 5,54 \cdot (472 / 12,6)^2 = 7774$  plateaux théoriques et  $\text{HEPT} = 25 / 7774 = 0,00322$  cm.

Il s'en suit que (les colonnes ayant la même hauteur) la colonne A est la plus efficace : les plateaux théoriques pour la caractérisation du composé envisagé sont plus nombreux que pour la colonne B et la HEPT est plus faible.

3. Ce résultat était difficile à prévoir ; en effet, le  $t_r$  est favorable dans le cas de la colonne B, mais c'est l'inverse pour  $\delta$ , ce qui montre une diffusion plus importante que dans le cas de la colonne A. Au total, la colonne B est moins efficace que la colonne A et cela confirme l'intérêt de la lutte contre la diffusion en chromatographie.

### Exercice 2 Etude chromatographique d'hémorphines

#### 1. Séparation par chromatographie de gel-filtration

1.1. Les molécules à séparer étant de relative petite taille, le gel de séparation doit être très réticulé, sinon tous les peptides à séparer diffuseraient totalement et leur volume d'éluion  $v_e$  serait égal au volume total de la colonne, soit  $v_t$ . Il n'y aurait alors aucune séparation.

1.2. Rappels :

- *facteur de sélectivité* : il représente la différence de comportement des molécules à étudier ; il est lié dans ce type de chromatographie à leur taille, à la porosité et à l'uniformité de la phase stationnaire. Les faibles différences de taille des molécules à séparer sont pratiquement compensées par la variabilité des pores ;

- *facteur de capacité* : il est faible dans ce type de chromatographie.  $K$  est voisin de 1 et le rapport  $v_S / v_M$  ne peut varier beaucoup puisque le gel est choisi en fonction des masses molaires des molécules à séparer ;

Pour améliorer la séparation, il convient alors d'augmenter le nombre de plateaux théoriques  $N$  (voir l'équation correspondante de la résolution dans la modélisation de la chromatographie) en augmentant, par exemple, la longueur de la colonne. Cela peut nécessiter une élévation de la pression de l'éluant, avec pour conséquence un tassement du gel. Dans ce cas, il est possible d'envisager une éluion par recyclage de la phase mobile. Il est également possible d'agir au niveau de la vitesse de passage de la phase mobile (voir théorie cinétique de la chromatographie dans la première partie du résumé du cours) ; une diminution de la vitesse de passage de la phase mobile favorise l'établissement des équilibres des molécules entre phase stationnaire et phase mobile.

#### 2. Séparation par chromatographie en phase inverse

2.1. Le sigle RP-HPLC veut dire " *Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography* ", c'est-à-dire chromatographie à haute performance (CLHP - HPLC) en phases inverses. La phase stationnaire est alors apolaire (ici probablement une silice greffée en  $C_{18}$ , présence de groupements  $-(CH_2)_{17}-CH_3$ ) et la phase mobile est polaire (voir sa composition dans l'énoncé).

2.2. Il s'agit d'une chromatographie de partage liquide-liquide, la phase stationnaire en  $C_{18}$  étant assimilée à un liquide apolaire. Les molécules se séparent grâce à une solubilité différentielle entre les deux phases. L'hydrophilie des molécules est liée à leur polarité.

La fraction VIIb est moins polaire que la fraction VIIa car elle possède une leucine supplémentaire à radical R apolaire. L'ordre de sortie est donc compatible avec le principe de séparation.

2.3. Estimation de la qualité de l'analyse chromatographique réalisée

- Calcul du volume mort théorique  $v_0$  :

$$v_0 = (0,95 \cdot 0,95) \cdot \pi \cdot 30 \cdot 70 / 100 = 59,5 \text{ mL}$$

- Calcul du temps  $t_0$  correspondant au volume mort théorique  $v_0$  :

$$t_0 = 59,5 / 12 = 5 \text{ min}$$

- Estimation sur le profil d'éluion de divers paramètres :

$$t_{rA} = 32,5 \text{ min}, t_{rB} = 34,9 \text{ min}, \omega_A = 1,85 \text{ min et } \omega_B = 1,40 \text{ min}$$

- Calcul du facteur de sélectivité :

$$\alpha_S = (t_{rB} - t_0) / (t_{rA} - t_0) = (34,9 - 5) / (32,5 - 5) = 1,1$$

- Calcul du facteur de capacité :

$$k'_B = (t_{rB} - t_0) / t_0 = (34,9 - 5) / 5 = 6$$

- Calcul de la résolution :

$$R_{sAB} = 2 \cdot (t_{rB} - t_{rA}) / (\omega_B + \omega_A) = 2 \cdot (34,9 - 32,5) / (1,85 + 1,40) = 1,5$$

Le facteur de sélectivité  $\alpha_S$  est supérieur à 1, le facteur de capacité  $k'_B$  est compris entre 2 et 10 et la résolution  $R_{sAB}$  est supérieure à 1. La séparation chromatographique est donc satisfaisante.

### Exercice 3 Electrochromatographie

1. Les composés 1, 3 et 4 sont des acides aminés. Le composé 2 est le dipeptide, puisque l'hydrolyse trypsique de l'échantillon a modifié l'aspect de l'électrochromatogramme.

Le composé 1 est la tyrosine, dont la chaîne latérale est phénolique. Son  $pH_i$  est légèrement inférieur à  $pH = 6,4$ ,  $pH$  de l'électrophorèse et, en effet, sa migration électrophorétique est faible. Son  $R_f$  en chromatographie est élevé, traduisant par là sa faible solubilité en milieu aqueux. La chromatographie effectuée est une chromatographie de partage, dont la phase mobile est organique, donc peu polaire ; la phase stationnaire est l'eau saturant les fibres de cellulose.

Le composé 3 est l'arginine, sensible au réactif de Sakaguchi. Il s'agit d'un acide aminé basique, donc chargé positivement à  $pH = 6,4$  et hydrosoluble, ce que confirment l'électrophorèse et la chromatographie.

Le composé 4 est forcément un autre acide aminé basique (migration électrophorétique) et hydrosoluble (comportement en chromatographie). Il s'agit par conséquent de la lysine, dont le  $pH_i$  est quelque peu inférieur à celui de l'arginine.

2. Le dipeptide contient de la tyrosine (réaction positive au réactif des phénols) et un acide aminé basique déjà présent avant hydrolyse trypsique (comportement électrophorétique, chromatographique, hydrolyse par la trypsine et absence d'apparition d'une nouvelle tache sur l'électrophorégramme). Il n'est pas possible de choisir entre l'arginine et la lysine, ayant des comportements voisins en électrophorèse et chromatographie. Le dipeptide peut donc être l'arginyltyrosine ou la lysyltyrosine.

3. La résine porteuse de groupements  $-COOH$  est un échangeur de cations faible. A  $pH = 6$ , il y a majoritairement des groupements  $-COO^-$  susceptibles de retenir les molécules chargées positivement, c'est-à-dire possédant un  $pH_i > 6$ . L'éluion fera donc apparaître le composé 1, puis 2 et enfin les composés 3 et 4, probablement dans les mêmes fractions, les  $pH_i$  des deux acides aminés n'étant pas suffisamment différents. La séparation ne sera pas de bonne qualité. La résolution du mélange est donc meilleure par association de deux technologies différentes, électrophorèse et chromatographie.

### Exercice 4 Séparation d'éléments nucléiques par CCM

En examinant la composition du mélange à analyser, on voit que la numérotation 1, 2, 3 et 4 correspond à l'augmentation de la polarité des molécules. Le composé le moins polaire, l'adénine, migre le moins loin et c'est donc cette molécule qui a la meilleure solubilité dans la phase stationnaire. Cette phase stationnaire est donc apolaire et la manipulation est une CCM de partage en phases inverses.

La présence des molécules sur la plaque produit un masquage de la fluorescence détecté par le scanner. Cette détection peut être quantitative, en reliant les quantités déposées aux surfaces des pics obtenus.

### Exercice 5 Étude d'une activité lipasique par HPLC

1. Les conditions de détermination des activités enzymatiques sont développées dans le chapitre correspondant. La concentration en substrat doit être saturante pour l'enzyme et il faut travailler dans des conditions déterminées de  $pH$ , température, ...

Dans le cas présent, il s'agit d'une méthodologie en deux points ; la réaction enzymatique est arrêtée au bout de 20 minutes, alors que l'on est encore en vitesse initiale maximale.

La gomme arabique, hydrosoluble, contribue à réaliser une émulsion entre le substrat de l'enzyme (liposoluble) et l'enzyme hydrosoluble. L'interaction enzyme-substrat s'en trouve par conséquent facilitée.

Le mélange chloroforme-méthanol stoppe la réaction enzymatique et extrait les composés liposolubles présents dans le milieu.

2. Il est possible de définir une unité enzymatique inspirée, par exemple, de l'unité internationale. Une unité enzymatique U sera alors la quantité d'enzyme qui fait apparaître une  $\mu\text{mole}$  d'acide oléique par minute dans les conditions de l'expérience (il est impossible ici de définir l'unité enzymatique par rapport au substrat, irrégulièrement hydrolysé puisque possédant 3 liaisons ester). Il faut rapporter cela à une unité de volume pour avoir la CAC en  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , par exemple.

Il apparaît  $0,6 \mu\text{mol}$  d'acide oléique en 20 min pour  $20 \mu\text{L}$  de prise d'essai de phase organique ayant extrait les composés liposolubles.

Le volume de phase organique total est de 0,5 mL ou 500  $\mu\text{L}$ . (1 mL de mélange volume à volume de chloroforme et méthanol) et cela correspond à 100  $\mu\text{L}$  d'extrait E,

$$\text{d'où} \quad \text{CAC} = \frac{0,6 \cdot 500 \cdot 1}{20 \cdot 20 \cdot 100 \cdot 10^{-3}} = 7,5 \text{ U}(\text{mL d'extrait E})^{-1}$$

3. Cette chromatographie est une chromatographie de partage en phases inverses. La phase stationnaire (silice greffée en  $\text{C}_{18}$ ) est apolaire et présente une affinité pour des composés eux-mêmes apolaires. L'identification et la quantification de l'acide oléique est rendue possible par utilisation d'un étalon externe d'acide oléique qui permet de préciser le  $t_r$  correspondant et de relier la quantité injectée à la surface du pic (concentration dans l'échantillon dont on injecte 20  $\mu\text{L}$ ).

4. L'hydrolyse du triglycéride sous l'action de l'enzyme peut être partielle. Dans la phase liposoluble, il y a alors le triglycéride (non hydrolysé), les composés résultant de l'hydrolyse partielle, c'est-à-dire le ou les diglycérides isomères (à comportement chromatographique supposé identique) et le ou les monoglycérides isomères (à comportement chromatographique supposé identique), en plus de l'acide oléique libéré.

Plus le composé est polaire, plus il sort rapidement de la colonne. Une fonction alcool est plus polaire qu'une fonction ester, donc pour les 3 composés en question, on a apparition du ou des monoglycérides, du ou des diglycérides, puis du triglycéride, conformément au principe de la séparation. Le composé le plus polaire est l'acide oléique, qui a donc le  $t_r$  le plus petit de tous les composés liposolubles présents.

### Exercice 6 Evaluation de la fraîcheur du poisson par dosage de l'histamine

1. La phase stationnaire est du type  $\text{Si-O}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ , donc à caractère apolaire prononcé. Il s'agit d'une chromatographie de partage en phases inverses ; plus les molécules à séparer ont un caractère apolaire, plus elles sont retenues.

2. L'élution s'effectue par un gradient eau-acétonitrile ; l'augmentation du pourcentage en acétonitrile diminue la polarité de la phase mobile : ceci permet l'élution des molécules les plus retenues, c'est-à-dire plus apolaires. La cadavérine possédant un groupement hydrogénéocarboné (méthylène) supplémentaire par rapport à la putrescine, a un caractère plus apolaire et donc forcément un temps de rétention supérieur.

3. L'utilisation d'un étalon externe suppose les étapes suivantes :

- réalisation d'étalons d'amines biogènes à concentrations différentes ;
- injection des étalons ainsi réalisés ;
- relier quantité injectée (concentration dans l'échantillon si les volumes injectés sont constants au cours de la manipulation) et aire des pics obtenus ;
- réalisation de la droite d'étalonnage ;
- report de l'aire des échantillons pour accéder à la concentration dans les échantillons.

Le principal souci dans l'utilisation d'un étalon externe est la reproductibilité du volume d'injection.

### 4. Préparation des échantillons

4.1. La dansylation de l'histamine, comme celle des autres amines biogènes, permet d'augmenter le caractère apolaire de ces molécules et permet également leur détection en sortie de colonne.

4.2. L'équation de la droite de régression de l'étalonnage (avec le point 0) est  $Y = 140,87 \cdot 10^6 \cdot X + 22,814 \cdot 10^6$  ;  $r = 0,9990$ . En reportant les aires obtenues à partir des échantillons dans l'équation, on obtient 3,8 et 7,7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

4.3. Calcul de la masse d'histamine en  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de poisson pour l'échantillon à 3,8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , qui correspond à l'échantillon supplémenté à 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

De l'étape 2 à l'étape 3, il y a une dilution au 1/3, donc la concentration dans le surageant est de  $3,8 \cdot 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ou  $3,8 \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Dans les 15 mL de surageant (5 g donc 5 mL d'échantillon + 2,5 mL de solution d'histamine + 7,5 mL de la solution d'acide perchlorique), il y a :

$$3,8 \cdot 3 \cdot 10^{-3} \cdot 15 = 0,171 \text{ mg pour 5 g de poisson, c'est à dire } 34,2 \text{ mg par kg de poisson.}$$

Un calcul identique donne 69,3 mg par kg de poisson pour l'autre échantillon.

4.4. Les rendements sont donc de 68,4 et 69,3 %. Ces rendements sont modestes et il y a lieu d'en tenir compte au niveau des calculs pour les dosages envisagés.

### Exercice 7 Le cytochrome c

#### 1. Fractionnement d'un mélange protéique sur Amberlite IR 120

##### 1.1. Détermination de la capacité de rétention de la résine

##### 1.1.1. Principe de la détermination de la capacité de rétention de la résine

Le lavage de la résine avec la solution de  $\text{HCl}$  à  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  permet d'être certain, a priori, d'avoir 100% (des groupements fonctionnels) de la résine sous forme  $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ . Après rinçage par l'eau déminéralisée, le passage de la solution de  $\text{NaCl}$  à  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  donne lieu à la réaction suivante :



Les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  libérés (représentant la capacité de rétention de la résine) sont alors neutralisés par les ions  $\text{OH}^-$  de la solution de  $\text{NaOH}$  à  $1,040 \text{ mol.L}^{-1}$ .

1.1.2. La capacité de rétention de la résine se calcule de la manière suivante : le nombre de moles d'ions  $\text{OH}^-$  ( $n_{\text{OH}^-}$ ) est égale au nombre de moles d'ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  ( $n_{\text{H}_3\text{O}^+}$ )

$n_{\text{OH}^-} = n_{\text{H}_3\text{O}^+} = 11,5 \cdot 1,040 = 11,96 \text{ mmol}$  pour 5 g de résine sèche,  
c'est-à-dire  $2,39 \text{ mmol}$  d'ions par g de résine sèche.

### 1.2. Fractionnement du mélange protéique

1.2.1. Le pH de la manipulation est égal à 5,6. Les protéines possédant un  $\text{pH}_i$  supérieur à 5,6 seront chargées positivement et d'autant plus positivement que l'écart  $\text{pH}-\text{pH}_i$  sera plus important. En conséquence, le cytochrome c sera chargé plus positivement que la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et, a fortiori, que l'isocitrate déshydrogénase. Quant à la glycérokinase, elle sera chargée négativement.

1.2.2. La résine Amberlite IR 120 est un échangeur de cations fort (la fonction acide est dissociée quel que soit le pH). Les protéines chargées positivement seront fixées par l'échangeur et d'autant plus fixées que la charge positive est importante. L'éluion se fera par ordre de charge positive croissante, la glycérokinase, non retenue, ne figurant pas sur ce profil d'éluion.

En conséquence, A = isocitrate déshydrogénase, B = glycérol-3-phosphate déshydrogénase et C = cytochrome c.

A et B sont des enzymes à coenzymes pyridiniques dont l'activité enzymatique est facile à détecter par spectrophotométrie à 340 nm et le cytochrome c a une structure de type tétrapyrrolique centrée sur un atome de fer, ce qui lui confère une couleur rouge.

### 2. Masse molaire minimale du cytochrome c

Une mole de cytochrome c contient au moins une mole d'atome de fer. D'après l'énoncé, 56 g correspondent à 0,426 % de la masse molaire moléculaire du cytochrome c, donc :

$$M = 56 \cdot 100 / 0,426 = 13150 \text{ g.mol}^{-1}$$

La masse molaire moléculaire du cytochrome c est soit  $13500 \text{ g.mol}^{-1}$  ou un multiple de cette valeur. Dans la littérature, il est indiqué que une mole de cytochrome c possède une mole d'atome de fer, donc  $13500 \text{ g.mol}^{-1}$  est la masse molaire moléculaire réelle du cytochrome c.

### 3. Composition en acides aminés soufrés.

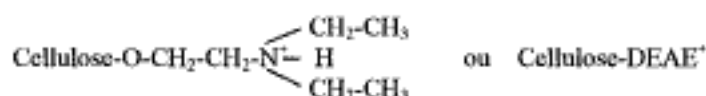
La masse de soufre par mole de cytochrome c est égale à  $13150 \cdot 0,97 / 100 = 128 \text{ g}$ , soit  $128 / 32 = 4$  moles d'atomes de soufre par mole de cytochrome c.

## Exercice 8 Chromatographie par échange d'ions

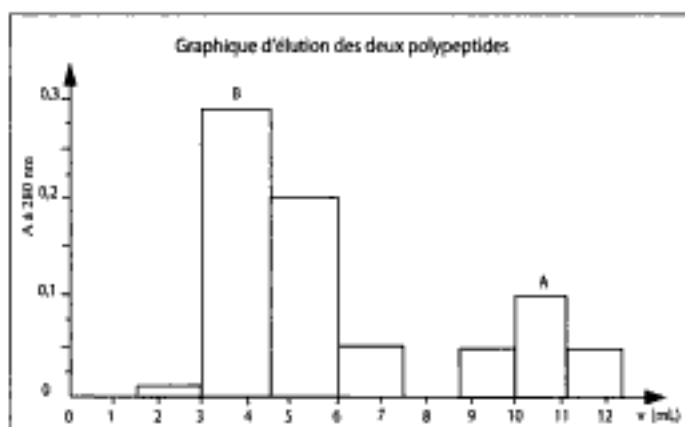
1. Les différents temps de l'expérience chromatographique sont les suivants :

- choix de l'échangeur (DEAE-cellulose) en suspension dans un tampon adéquat à  $\text{pH} = 8,8$  ;
- remplissage et équilibrage de la colonne par voie humide ;
- dépôt de l'échantillon à analyser ;
- éluion par un gradient décroissant de pH ;
- recueil et analyse spectrophotométrique des fractions à analyser (les acides aminés aromatiques constitutifs de A et B absorbent à 280 nm).

Remarque : l'échangeur peut se symboliser de la manière suivante à  $\text{pH} = 8,8$  :



2. La détection étant discontinue, un graphique sous forme d'histogramme est plus approprié :





Hidden page

Ces résultats montrent qu'il convient d'utiliser l'échangeur à un pH inférieur à 9,5 (prédominance de la forme Sephadex-DEAE<sup>-</sup>), la forme Sephadex-DEAE étant inefficace.

4. L'interaction des molécules avec la phase stationnaire chromatographique est due à la présence de groupements phosphate chargés négativement. Cela justifie l'ordre d'éluion des différents composés : base, nucléosides mono-, puis di- et enfin triphosphates. L'échangeur peut être utilisé à un pH voisin de la neutralité pour répondre à un double objectif, forme ionique convenable de l'échangeur et charge négative des phosphates. La mesure de l'absorbance se fait à 260 nm, maximum d'absorption des bases puriques et pyrimidiques libres ou constitutives des nucléotides.

### Exercice 11 Détermination de la masse molaire moléculaire d'une protéase

La manipulation est menée correctement, car toutes les molécules utilisées se situent dans le domaine de fractionnement du gel utilisé. Ne pouvant connaître ni  $v_t$  (volume total), ni  $v_o$  (volume mort), il n'est pas possible de calculer les  $K_{av}$  des molécules protéiques utilisées. Il convient alors d'effectuer une étude du volume d'éluion  $v_e$  des molécules en fonction du logarithme décimal des masses molaires correspondantes.

Le pic 1 est attribué à la LDH et le pic 4 à l'ovalbumine, conformément au principe de la gel-filtration et à sa mise en œuvre (voir énoncé). Une ambiguïté apparaît au niveau des pics 2 et 3 que l'on peut attribuer soit à la PAL, soit à la protéase. Il convient donc d'envisager les 2 possibilités et de voir quelle est la meilleure droite obtenue pour l'étalonnage, par régression linéaire ou par une représentation graphique adéquate.

- 1<sup>er</sup> cas :

| Marqueur   | M (g.mol <sup>-1</sup> ) | log M | $v_e$ |
|------------|--------------------------|-------|-------|
| LDH        | 145000                   | 5,161 | 53,0  |
| PAL        | 80000                    | 4,903 | 76,7  |
| Ovalbumine | 45000                    | 4,653 | 83,2  |

Le coefficient de régression de la droite  $v_e = f(\log M)$  est  $r = 0,9411$ , ce qui n'est pas bon.

Dans ce cas, pour la protéase,  
 $\log M = 4,943$  et  $M = 87700 \text{ g}^{-1}$

- 2<sup>e</sup> cas :

| Marqueur   | M (g.mol <sup>-1</sup> ) | log M | $v_e$ |
|------------|--------------------------|-------|-------|
| LDH        | 145000                   | 5,161 | 53,0  |
| PAL        | 80000                    | 4,903 | 67,4  |
| Ovalbumine | 45000                    | 4,653 | 83,2  |

Le coefficient de la nouvelle droite de régression est de 1,000, ce qui est évidemment excellent !

On a  $\log M = 4,765$  et  $M = 58200 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Il convient de retenir le deuxième cas de figure, vu la meilleure linéarité de la droite d'étalonnage.

**Remarque :** pour la détermination d'une masse molaire moléculaire par gel-filtration, il est possible de représenter

$$K_{av} = f(\log M) \quad \text{si } 0 < K_{av} < 1$$

Si, comme ici, il n'est pas possible de calculer  $K_{av}$ , on représente  $v_e = f(\log M)$  à condition que  $v_o < v_e < v_t$ .

$K_{av}$  est néanmoins un paramètre chromatographique plus lisible que  $v_e$ , puisqu'il s'affranchit des caractéristiques géométriques de la colonne.

### Exercice 12 Chromatographie par gel-filtration

1. Le gel à utiliser pour déterminer  $M_x$  est le gel B.

En effet, le gel B est le seul gel qui possède des  $v_e$  différents pour chacun des marqueurs. La détermination de  $M_x$  peut s'effectuer en un seul passage sur la colonne, malgré la mauvaise résolution.

Le gel B sépare des substances ayant une masse molaire comprise entre  $4 \cdot 10^4$  et  $4 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , ce qui veut dire que le Bleu dextran est exclu ( $v_e = v_o = 45 \text{ mL}$ ) et que la lactoglobuline diffuse totalement ( $v_e = v_t = 132 \text{ mL}$ ). Il ne reste plus que 2 marqueurs directement utilisables et l'ensemble suggère d'exploiter la relation linéaire existant entre  $K_{av}$  (calculable dans cet exercice) et le  $\log M$ .

$$2. \quad K_{av} \text{ du fibrinogène} = (v_e - v_o) / (v_t - v_o) = (113 - 45) / (132 - 45) = 0,17$$

$$K_{av} \text{ de la catalase} = (73 - 45) / (132 - 45) = 0,32$$

L'équation de la droite reliant catalase et fibrinogène est :

$$K_{av} = -0,882 \cdot \log M + 5,049. \text{ On a } K_{av} = 0,78 \text{ d'où } \log M_x = 4,839 \text{ et } M_x = 69000 \text{ g.mol}^{-1}$$

Cette valeur est bien comprise dans l'intervalle de séparation du gel B.

Hidden page

L'éluion de la trypsine recombinante s'effectue ici par utilisation d'un tampon concentré en imidazole, qui interagit avec le nickel de la phase stationnaire et qui va déplacer la trypsine du fait de la loi d'action de masse.

Ce type de chromatographie peut être rapproché de la chromatographie par interactions biospécifiques.

### 2. Calcul de la CAC de E2

Le calcul de la CAC de E2 s'effectue à partir de la relation vue dans le chapitre consacré à l'enzymologie avec un  $\epsilon$  molaire du PNA égal à  $880 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ , soit  $8800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . On a donc,

$$\text{CAC} = 0,07 \cdot 10^6 \cdot 2 / (8800 \cdot 0,1) = 1,59 \cdot 10^5 \text{ ULL}^{-1} \text{ ou } 159 \text{ ULmL}^{-1}$$

### 3. Calcul du rendement et de l'enrichissement

L'activité totale de E1 =  $43 \cdot 300 = 12900 \text{ UI}$ . L'activité totale de E2 =  $159 \cdot 60 = 9540 \text{ UI}$ .

Le rendement est donc de  $9540 \cdot 100 / 12900$  soit environ 74 %.

L'activité spécifique de E1 =  $43 / 3,8 = 11,3 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

L'activité spécifique de E2 =  $159 / 0,2 = 795 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

L'enrichissement est donc de  $795 / 11,3 = 70,4$ .

On retrouve des performances classiques aux chromatographies d'interactions biospécifiques.

# 11 - Méthodes électrophorétiques

## Principes généraux de l'électrophorèse

### 1. Définition

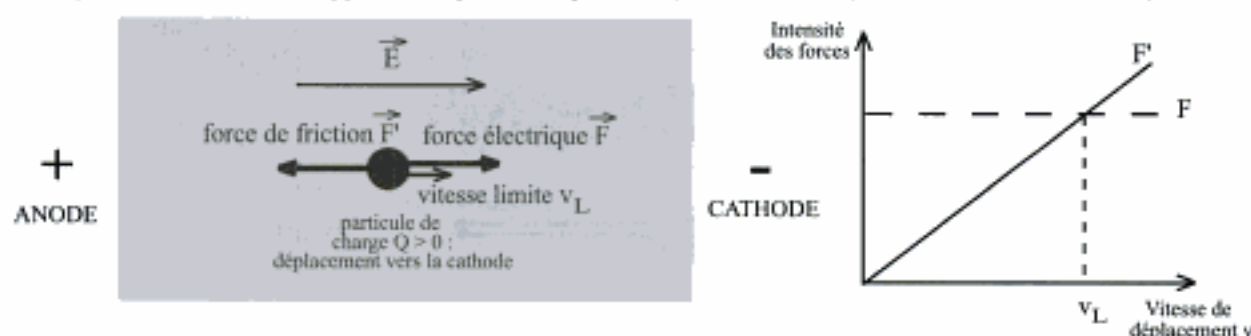
- Méthode de séparation de particules chargées dans un champ électrique continu.
- Au sens strict : l'électrophorèse est une séparation de macromolécules chargées ;
  - Autre terme : l'ionophorèse est une séparation de petites molécules.

### 2. Principe (en veine liquide)

Soit une particule de charge positive  $+Q$ , supposée sphérique (rayon  $r$ ), dans un milieu liquide de viscosité  $\eta$  et dans un champ électrique  $E$ .

Cette particule est soumise :

- à une force électrique  $\vec{F} = Q \cdot \vec{E}$  (déplacement vers le pôle de charge opposée) ;
- à une force de frottement  $\vec{F}'$  de sens opposé au déplacement et proportionnelle à la vitesse de déplacement  $v$  de la particule (cette force s'oppose au déplacement précédent),  $\vec{F}' = f \cdot \vec{v}$  ( $f$  : coefficient de frottement).



Au bout d'un certain temps la particule se déplace avec un mouvement rectiligne uniforme (égalité des forces : accélération  $\gamma$  nulle) : la vitesse de déplacement  $v$  atteint une valeur constante : la **vitesse limite  $v_L$**  :

$$\vec{F} + \vec{F}' = m \cdot \vec{\gamma} = \vec{0}$$

soit en valeur absolue :  $Q \cdot E - f \cdot v_L = 0$

$$v_L = \frac{Q}{f} \cdot E = u \cdot E$$

**u : mobilité électrophorétique (absolue)** caractéristique de la particule

$$u = \frac{v_L}{E} = \frac{Q}{f}$$

La particule étant supposée être une sphère de rayon  $r$ ,  $f = 6 \pi \cdot \eta \cdot r$ , les expressions de la vitesse limite et de la mobilité électrophorétique  $u$  sont :

$$v_L = \frac{Q}{6 \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot E \quad \text{et} \quad u = \frac{Q}{6 \pi \cdot \eta \cdot r}$$

### 3. Effets de divers paramètres sur la mobilité électrophorétique $u$

#### 3.1. Electrophorèse en veine liquide

Cette technologie ancienne (mise au point par Arne Tiselius) permettait la détermination de la mobilité électrophorétique absolue définie précédemment.

Etude simplifiée de l'effet de divers paramètres sur la mobilité électrophorétique  $u$  :

| Effet de la charge                                              | Effet de la force ionique $\mu$                                                          | Effet du rayon $r$ de la particule                                                                                  | Effet de la viscosité $\eta$                                                          | Effet de la température $\theta$                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Effet du pH<br>charge +      charge -<br> <br>pH <sub>i</sub> → | $u \searrow$ si $\mu \nearrow$<br>La mobilité diminue lorsque la force ionique augmente. | $u \searrow$ si $r \nearrow$<br>La mobilité diminue lorsque le rayon de la particule (supposée sphérique) augmente. | $u \searrow$ si $\eta \nearrow$<br>La mobilité diminue lorsque la viscosité augmente. | $u \searrow$ si $\theta \nearrow$ car $\eta \nearrow$<br>La mobilité diminue lorsque la température augmente car, dans ces conditions, la viscosité augmente. |

### 3.2. Electrophorèse sur support (mobilité électrophorétique apparente)

Migration dans un support poreux imbibé de tampon.

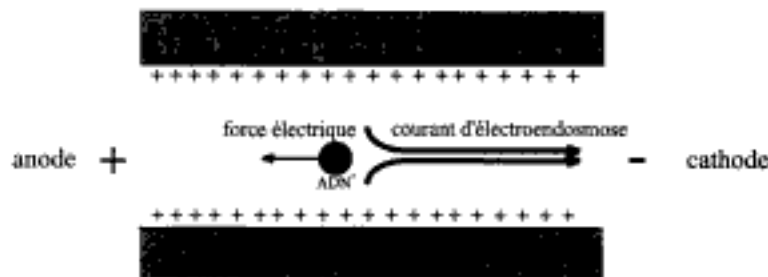
Les supports classiques sont : le papier, le gel d'acétate de cellulose modifié, le gel d'agarose et le gel de polyacrylamide. Le support sert, entre autres, à minimiser la diffusion des substances lors de la migration (étalement des bandes).



La mobilité observée est alors une **mobilité électrophorétique apparente** qui dépend :

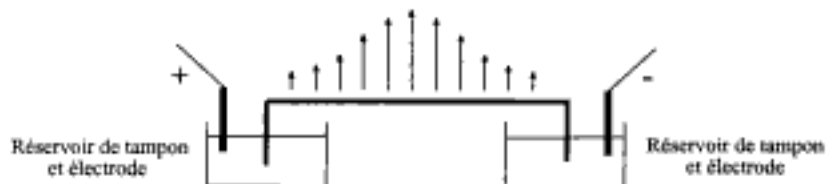
- de la mobilité absolue (relation non linéaire, mathématiquement complexe) ;
- des caractéristiques du support :
  - \* caractéristiques des pores des canalicules au sein desquels s'effectue la migration (diamètre, homogénéité des tailles, tortuosité du chemin à parcourir, ...)
  - \* importance des fixations non spécifiques (adsorption) sur le support des substances à séparer ;
- de courants liquidiens qui se mettent en place du fait de la présence du support durant la migration. Ces courants vont, selon le cas, favoriser ou défavoriser la migration :

\* **Courant d'électroendosmose** (le plus important) : flux de tampon, dirigé vers la cathode, constitué de la partie cationique du tampon (entraînant de l'eau) neutralisant les charges portées par le support ; ce courant s'oppose à la migration de particules chargées négativement (ADN en solution dans le tampon TRIS, par exemple).

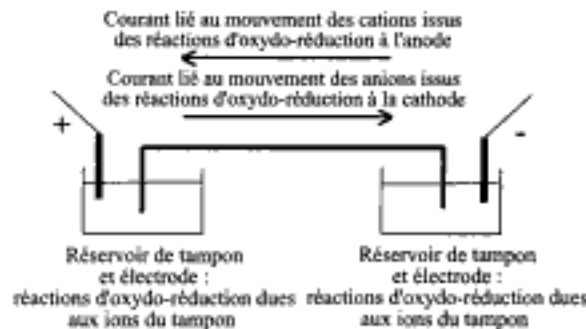


\* **Courant de rhéophorèse** : courant liquidiens lié à l'évaporation du liquide due à l'effet Joule au niveau du support, d'où un appel liquidiens depuis les deux réservoirs de tampon.

Effet maximal au centre



\* **Courant d'électrophorèse** : courant liquidiens lié au mouvement des produits d'oxydo-réduction du tampon aux électrodes.



**Conclusion** concernant l'électrophorèse sur support :

- distance de migration non proportionnelle au temps de migration ;
- migration selon la taille (tamisage moléculaire) et la charge, parfois selon la taille seule (voir plus loin, SDS PAGE).

Hidden page

Hidden page



Hidden page

Hidden page

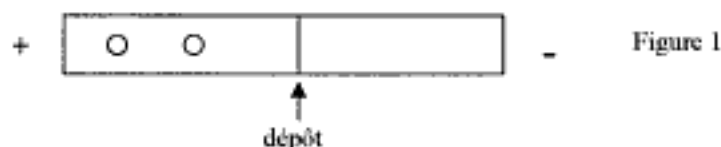


Figure 1

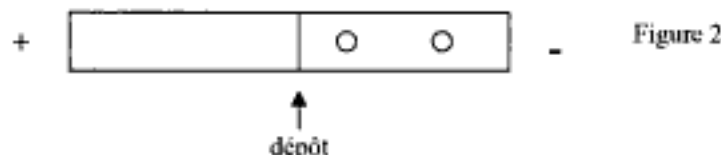


Figure 2

- Laquelle de ces figures correspond à  $\text{pH} = 1$  ?
- Laquelle de ces figures correspond à  $\text{pH} = 13$  ?
- Quel électrophorégramme obtiendrait-on à  $\text{pH} = 7$  ?

#### Exercice 4 Mobilité électrophorétique

Un peptide P présente la séquence suivante : His-Lys-Pro-Arg-Gly-Glu. Le peptide P est soumis à l'action de la trypsine et les fragments qui en résultent sont séparés par électrophorèse à  $\text{pH} = 9,85$ .

1. Calculer la mobilité électrophorétique relative de chacun des fragments obtenus à la suite de l'hydrolyse trypsique.
2. Le choix de réaliser l'électrophorèse à  $\text{pH} = 9,85$  est-il judicieux ?

Données :

- la mobilité électrophorétique relative  $u$  d'un fragment se calcule à partir de l'expression :  
 $u = (\text{pH} - \text{pH}_i) / M$ ,  $M$  étant la masse molaire moléculaire du fragment concerné en  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- $\text{pK}_a$  des acides aminés impliqués dans la structure du peptide : His (1,82 - 6,00 - 9,17), Lys (2,18 - 8,95 - 10,5), Pro (1,99 - 10,6), Arg (2,17 - 9,04 - 12,5), Gly (2,34 - 9,60), Glu (2,19 - 4,25 - 9,67) ;
- masses molaires moléculaires des acides aminés impliqués en  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  : His (155), Lys (146), Pro (115), Arg (174), Gly (75), Glu (147) ;
- la trypsine coupe la liaison peptidique du côté carboxylique d'une lysine ou d'une arginine.

#### Exercice 5 Etude de la papaïne

La papaïne, enzyme d'origine végétale, présente de nombreuses applications industrielles (brasserie, hydrolysats de poissons, ...) et pharmaceutiques. Elle est extraite d'un latex obtenu à partir de la tige, des feuilles et des fruits du papayer.

A partir d'un extrait  $E_1$  de latex, on prépare par filtration sur Kieselguhr de la papaïne "industrielle" (extrait  $E_2$ ), puis par gel-filtration de la papaïne "commercialisée" (extrait  $E_3$ ).

1. Etude des extraits  $E_2$  et  $E_3$  par électrophorèse sur acétate de cellulose

Une électrophorèse sur acétate de cellulose des extraits  $E_2$  et  $E_3$  donne les résultats schématisés sur la figure 1 (électrophorégrammes A et B).

L'utilisation, en parallèle, d'étalons (chymopapaïne, lysozyme, papaïne purifiée) donne les résultats également schématisés sur la figure 1 (électrophorégrammes C, D et E).

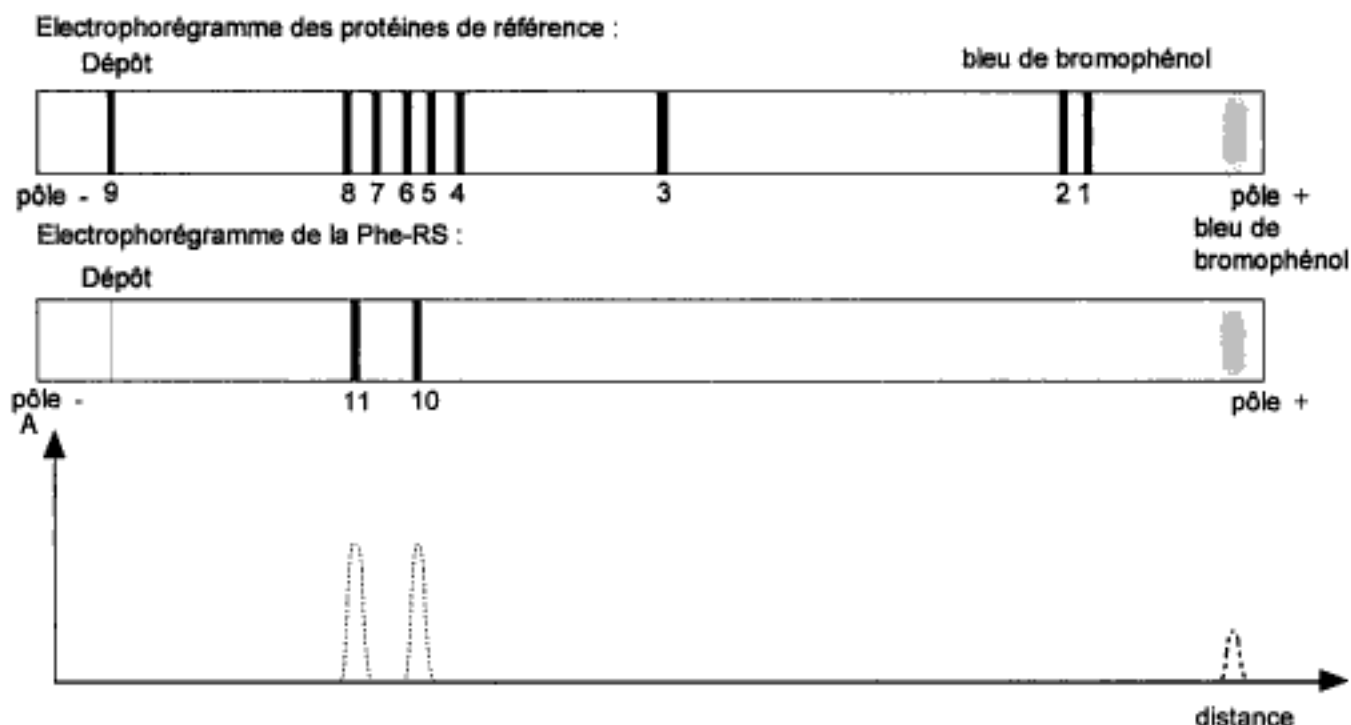
L'électrophorèse est réalisée dans les conditions suivantes :

- tampon Tris-glycine  $\text{pH} = 9,3$  ;
- $\text{ddp} = 200 \text{ V}$  ;
- dépôt de  $10 \mu\text{L}$  à  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ;
- coloration à l'Amidoschwartz.

- 1.1. Analyser les résultats obtenus. Quel est l'ordre de grandeur du  $\text{pH}_i$  des protéines impliquées dans l'électrophorèse ? De quel type de protéines s'agit-il ?
- 1.2. Justifier l'utilisation de l'extrait  $E_3$  en pharmacologie.

Hidden page

Figure 1 : Electrophorogrammes et densitogramme



Exploiter les résultats expérimentaux et à l'aide de la masse molaire moléculaire obtenue par gel-filtration, déterminer la structure oligomérique de la Phe-RS.

### Exercice 7 Séquençage d'un polynucléotide

La protection contre l'hépatite B peut s'effectuer par vaccination à l'aide de particules virales hybrides. La production de particules hybrides hépatite B / poliovirus peut se réaliser grâce à un plasmide pPAP, qui comprend :

- le gène S codant pour la protéine HbS du virus de l'hépatite B ("Hepatitis B Virus" ou HBV) ;
- une région SV 40 empruntée au virus du même nom qui permet de placer le gène S sous la dépendance d'un promoteur, ce qui est nécessaire pour la synthèse des protéines S du virus de l'hépatite B (ou protéines HBS) ;
- une séquence nucléotidique de 33 paires de bases insérée dans le gène S au niveau d'un site de clivage unique reconnu par l'enzyme de restriction *Bam* HI ; cette séquence code pour un fragment de la protéine de capsid VP1 du poliovirus (séquence VP).

Le séquençage d'une portion de 300 nucléotides de l'ADN plasmidique comprenant la séquence VP a permis de vérifier la conservation de l'intégralité du fragment inséré. Les principales étapes de la méthode utilisée (méthode de Sanger) sont résumées sur le document 1, de même que les résultats obtenus.

1. Indiquer sommairement le principe de la méthode de Sanger.
2. Le fragment polypeptidique de la protéine VP1 du poliovirus est codé par la séquence VP de 33 paires de bases. Cette dernière débute au repère D (inclus) et finit au repère F (inclus) sur l'électrophorogramme. Indiquer la séquence directement lisible du polynucléotide d'intérêt révélé par l'électrophorogramme. En déduire la séquence du fragment analysé (séquence donnée dans l'ordre conventionnel 5' → 3').
3. A l'aide du code génétique (voir résumé de cours de biologie moléculaire et génie génétique), préciser la séquence des 11 acides aminés correspondant à la séquence VP insérée dans le gène S.

Donnée : l'ARN messager permettant cette synthèse a la même séquence nucléotidique que le fragment d'ADN précédemment séquencé ; c'est donc le brin d'ADN complémentaire qui a été transcrit par l'ARN polymérase.

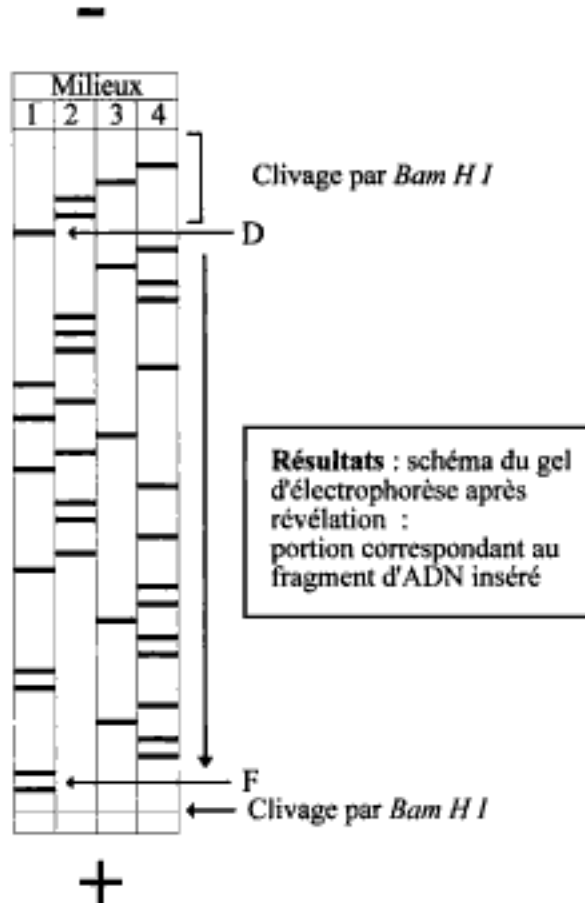
#### Document 1 : la méthode de Sanger

- **Etape 1** : synthèse de multiples copies plus ou moins longues du fragment d'ADN monobrin à séquencer. Les milieux réactionnels comprennent :

- un fragment à séquencer simple brin et une amorce ou "primer" ;
- l'ADN polymérase I (fragment de Klenow) ;
- un mélange de dATP, dTTP, dCTP, dGTP ;
- selon les cas,
  - pour le milieu 1 : ddCTP et dCTP radioactif (dCTP<sup>\*</sup>) ;
  - pour le milieu 2 : ddGTP et dGTP radioactif (dGTP<sup>\*</sup>) ;
  - pour le milieu 3 : ddATP et dATP radioactif (dATP<sup>\*</sup>) ;
  - pour le milieu 4 : ddTTP et dTTP radioactif (dTTP<sup>\*</sup>) .

L'incubation pour chaque milieu réactionnel s'effectue à 25 °C pendant 30 minutes.

- **Etape 2** : dénaturation de l'ADN double brin formé par l'urée ;
- **Etape 3** : séparation des fragments d'ADN néosynthétisés dans chaque milieu réactionnel par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE).



### Exercice 8 Séquençage d'un oligonucléotide par méthode enzymatique

On se propose de séquencer par la méthode de Sanger l'oligonucléotide suivant :



La séquence soulignée sert à la fixation de l'amorce.

On réalise une électrophorèse des fragments obtenus dans les conditions suivantes :

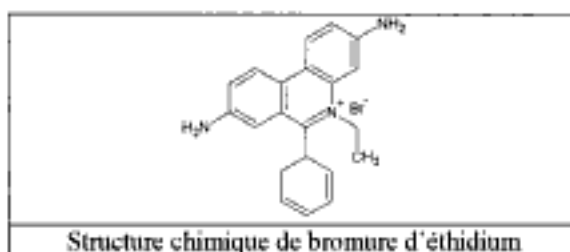
- gel de polyacrylamide contenant de l'urée et du formamide ;
- température de 70°C.

1. Expliquer l'intérêt des ces conditions opératoires.
2. Indiquer la séquence de chaque fragment obtenu après polymérisation.
3. Représenter l'aspect du gel obtenu après électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

### Exercice 9 Détermination de la taille d'un fragment d'ADN par électrophorèse

On se propose de déterminer la taille d'un fragment d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 % (m/v). La migration est effectuée dans un tampon à pH = 8,3.

1. Rappeler le principe de cette technique et les paramètres affectant la migration de l'ADN.
2. Dans quel sens s'effectue la migration des fragments ? Justifier la réponse.
3. Quelle serait la vitesse de migration des molécules dans un gel d'agarose à 0,8 % (m/v) par rapport à celle obtenue dans un gel d'agarose à 0,6 % ?
4. Après migration, le gel est imbibé dans une solution de bromure d'éthidium (BET). Expliquer le mode d'action de ce composé et les précautions à prendre quant à sa manipulation.



5. Le tableau ci-dessous indique la distance de migration " d " en cm de marqueurs de taille " L " exprimée pour chacun d'entre eux en paires de bases (pb) :

|        |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| L (pb) | 220 | 300 | 320 | 390 | 500 | 1000 | 1600 | 2000 | 3050 | 4075 | 5080 | 6108 |
| d (cm) | 5,4 | 5,1 | 5   | 4,8 | 4,4 | 3,3  | 2,6  | 2,2  | 1,7  | 1,3  | 1,1  | 0,9  |

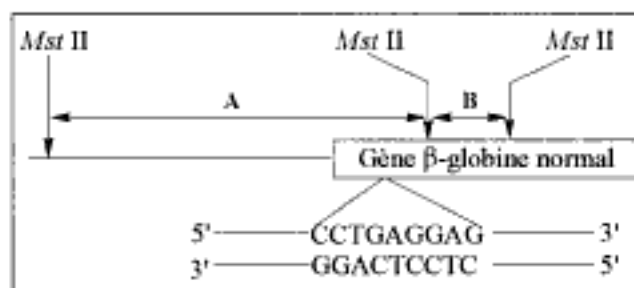
Tracer la courbe  $\log(L) = f(d)$ , en déduire la taille du fragment d'ADN étudié, sachant que la distance mesurée pour ce fragment est de 4,1 cm.

#### Exercice 10 Diagnostic génétique de la drépanocytose

La drépanocytose est une anomalie qualitative de l'hémoglobine due à une mutation de la chaîne  $\beta$  de la globine entraînant la production d'une hémoglobine anormale notée Hb S.

La mutation concerne le codon numéro 6 du gène : GAG qui code pour l'acide glutamique est remplacé par GTG qui code pour la valine.

Le schéma ci-dessous montre les sites de restriction *Mst* II de la région du gène normal de la chaîne  $\beta$  de la globine.



La taille des fragments obtenus est la suivante : A = 1,15 kb et B = 0,20 kb.

Trois échantillons d'ADN provenant de trois individus différents (normal, homozygote et hétérozygote) sont soumis successivement à une analyse par Southern blot avec *Mst* II et à une sonde moléculaire marquée à son extrémité 5' par du  $^{32}\text{P}$  ( $\dot{\text{P}}$ ) qui reconnaît spécifiquement la région 1,15 kb.

Donnée :

Site de coupure de *Mst* II :



N désigne n'importe quel nucléotide,  $\uparrow$  désigne le site de coupure de l'enzyme.

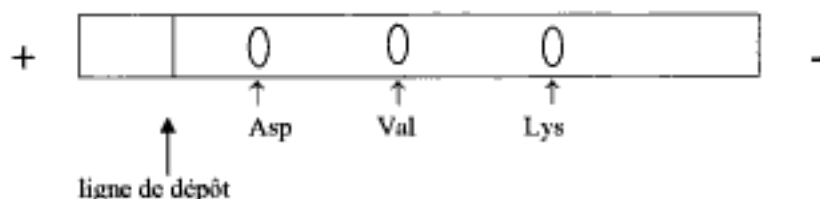
1. Expliquer la technique de marquage radioactif de la sonde.

2. Quel est le profil électrophorétique après un Southern blot d'un échantillon sanguin d'un sujet normal ? Celui d'un sujet atteint de drépanocytose homozygote ? Celui d'un sujet atteint de drépanocytose hétérozygote ?

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Séparation électrophorétique de trois acides aminés

#### 1. Position des trois acides aminés du mélange



A  $\text{pH} = 2$ , tous les acides aminés sont chargés positivement, car ce  $\text{pH}$  est inférieur aux différents  $\text{pH}_i$  respectifs des acides aminés étudiés. La charge électrique globale des acides aminés est d'autant plus importante que l'écart entre le  $\text{pH}$  de l'expérience et le  $\text{pH}_i$  de l'acide aminé est important. Ainsi, la lysine migre davantage que la valine, qui, elle-même, migre davantage que l'acide aspartique.

#### 2. Emplacement de la ligne de dépôt du mélange

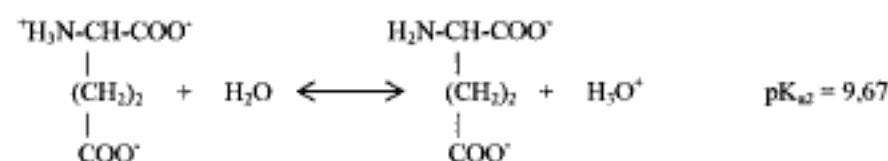
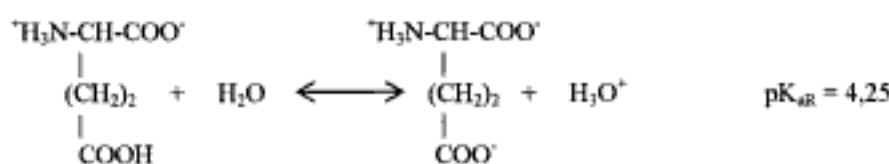
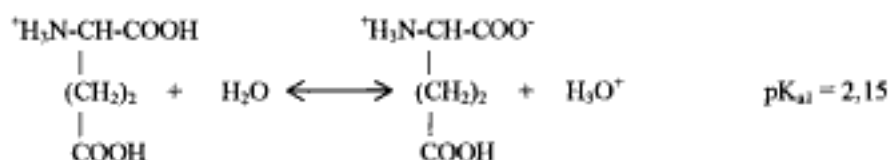
A  $\text{pH} = 2$ , tous les acides aminés (chargés positivement) migrent vers la cathode (pôle -). Placer la ligne de dépôt du mélange près de l'anode (pôle +) permet de libérer un maximum d'espace pour la séparation des acides aminés.

### Exercice 2 Séparation électrophorétique de deux acides aminés

#### 1. $\text{pH}_i$ de l'alanine

$$\text{pH}_i = (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2}) / 2 \quad \text{soit} \quad \text{pH}_i = (2,35 + 9,69) / 2 = 6,02$$

#### 2. Equations d'ionisation successives de l'acide glutamique



#### 3. $\text{pH}_i$ de l'acide glutamique

$$\text{pH}_i = (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{aR}) / 2 \quad \text{soit} \quad \text{pH}_i = (2,19 + 4,25) / 2 = 3,22$$

#### 4. Sens de migration des acides aminés

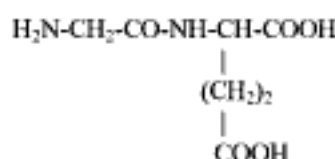
A  $\text{pH} = 5$  :

- l'alanine, chargée positivement ( $\text{pH} < \text{pH}_i$ ) migre vers la cathode (pôle -) ;
- l'acide glutamique, chargé négativement ( $\text{pH} > \text{pH}_i$ ) migre vers l'anode (pôle +).



**Exercice 3** Electrophorèse de peptides

La charge nette d'un peptide à un pH donné se détermine en fonction des  $pK_a$  des groupements ionisables non impliqués dans la ou les liaisons peptidiques. Par exemple, pour le peptide Gly-Glu dont la structure est donnée ci-dessous :



il faut considérer le  $pK_{a2}$  de Gly (9,60) et les  $pK_{a1}$  et  $pK_{aR}$  de Glu (2,19 et 4,25). On suppose que les différents  $pK_a$  concernés sont pratiquement identiques dans l'acide aminé libre et dans le peptide. A pH = 1, le peptide est donc sous la forme  $P^+$ , à pH = 7, le peptide est sous la forme  $P^0$  et à pH = 13, il est sous la forme  $P^{2-}$ .

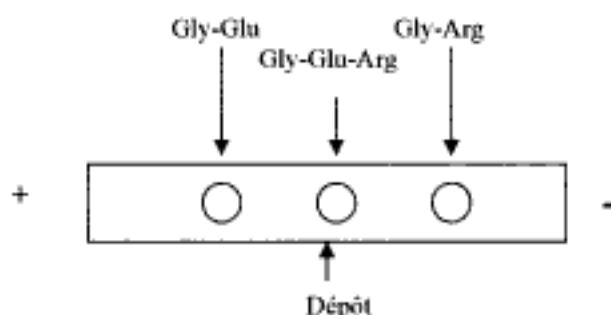
Les charges nettes des peptides aux différents pH prévus par l'énoncé sont indiquées dans le tableau suivant :

| Peptides    | pH = 1 | pH = 7 | pH = 13 |
|-------------|--------|--------|---------|
| Gly-Arg     | 2+     | 1+     | 1-      |
| Gly-Glu     | 1+     | 1-     | 2-      |
| Gly-Glu-Arg | 2+     | 0      | 2-      |

- La figure 1 correspond à pH = 13. En effet, tous les peptides migrent vers l'anode (pôle +) et sont donc chargés négativement. Les peptides Gly-Glu et Gly-Glu-Arg migrent au même niveau et davantage que le peptide Gly-Arg.

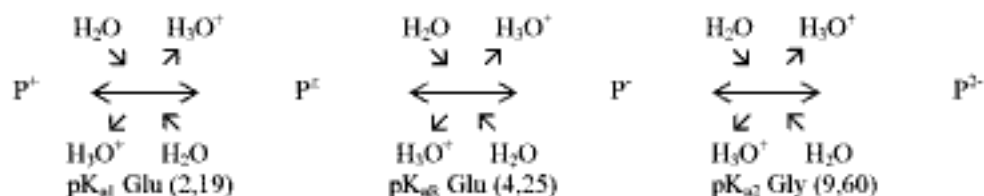
- La figure 2 correspond à pH = 1. En effet, tous les peptides migrent vers la cathode (pôle -) et sont donc chargés positivement. Les peptides Gly-Arg et Gly-Glu-Arg migrent au même niveau et davantage que le peptide Gly-Glu.

- A pH = 7, on obtiendrait l'électrophorégramme suivant :

**Exercice 4** Mobilité électrophorétique

1. La trypsine coupe la liaison peptidique du côté carboxylique après Lys ou Arg. Suite à l'action de la trypsine, on obtient donc les peptides suivants : His-Lys, Pro-Arg et Gly-Glu.

Le  $pI$  d'un peptide se déduit facilement à partir de l'écriture des différentes formes ioniques possibles. Par exemple, pour le peptide Gly-Glu, dont la structure est donnée dans l'exercice précédent, on a les dissociations et les formes ioniques suivantes :



$$pI \text{ du peptide} = (pK_{a1} + pK_{aR}) / 2 \text{ soit } pI = (2,19 + 4,25) / 2 = 3,22$$

Le tableau suivant récapitule les différents peptides obtenus suite à l'action de la trypsine, leur masse molaire,  $pI$  et mobilité électrophorétique relative :

| Peptides | M en $\text{g.mol}^{-1}$ | $pI$ | $u$ à pH = 9,84 |
|----------|--------------------------|------|-----------------|
| His-Lys  | 283                      | 9,84 | 0,000           |
| Pro-Arg  | 271                      | 11,6 | - 0,006         |
| Gly-Glu  | 204                      | 3,22 | + 0,032         |

2. Le choix de réaliser l'électrophorèse à pH = 9,84 est judicieux, puisque  $u$  est différent pour chaque peptide.

Remarque : le signe de la mobilité relative indique le signe de l'électrode vers laquelle migre le peptide.

**Exercice 5 Etude de la papaïne****1. Etude des extraits E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub> par électrophorèse sur acétate de cellulose**

1.1. L'extrait E<sub>2</sub> (électrophorégramme A) contient de la papaïne, mais celle-ci est contaminée par la chymopapaïne et le lysozyme.

L'extrait E<sub>3</sub> (électrophorégramme B) est constitué de papaïne pure.

Les protéines migrent toutes vers la cathode et sont donc chargées positivement à pH = 9,3. Leur pI<sub>i</sub> est supérieur à 9,3 ; il s'agit de protéines basiques.

1.2. La papaïne est utilisée en pharmacologie pour ses propriétés protéolytiques, par exemple, en gastro-entérologie. Il convient qu'elle soit pure et avec un titre protéolytique donné.

**2. Détermination de la masse molaire moléculaire M de la papaïne pure**

2.1. Principe de la détermination (voir résumé du cours)

2.2. Détermination de la masse molaire moléculaire

Il convient de représenter d en fonction de log(M) (ou log(M) en fonction de d). L'équation de la droite obtenue en représentant d en fonction de log(M) est  $d = -82,673 \cdot \log(M) + 420,29$ .

Pour la papaïne, on a  $\log(M) = 4,3641$ , soit M de l'ordre de 23100 g.mol<sup>-1</sup>.

**Exercice 6 Etude de la phénylalaninyl-tRNA synthétase (Phe-RS) de levure**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide permet de déterminer la masse molaire moléculaire de la Phe-RS. Par comparaison avec le résultat obtenu en gel-filtration, il sera possible d'en déduire la structure oligomérique de l'enzyme. En effet, l'électrophorèse s'effectuant en conditions dénaturantes, on aura la masse molaire moléculaire des sous-unités (SU) éventuelles et non celle de la protéine native.

Pour l'étalonnage, il convient de représenter la distance d parcourue par les protéines en fonction du log de la masse molaire moléculaire pour les protéines de référence monomériques ou en fonction du log de la masse molaire moléculaire des sous-unités pour les protéines de référence oligomériques. L'électrophorégramme correspondant révélant 9 bandes pour les 9 protéines de référence, chaque protéine oligomérique est constituée de sous-unités de masse molaire moléculaire identique.

| Position sur la bande | Protéine                | M <sub>SU</sub> en g.mol <sup>-1</sup> | log de M <sub>SU</sub> | d en cm |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------------------|------------------------|---------|
| 1                     | Cytochrome c            | 13500                                  | 4,13                   | 13,05   |
| 2                     | Lysozyme                | 14400                                  | 4,16                   | 12,65   |
| 3                     | Alcool déshydrogénase   | 37500                                  | 4,57                   | 7,35    |
| 4                     | Catalase                | 60000                                  | 4,78                   | 4,65    |
| 5                     | Fumarase                | 64000                                  | 4,81                   | 4,25    |
| 6                     | Sérum albumine          | 67000                                  | 4,83                   | 3,95    |
| 7                     | Arginyl-tRNA synthétase | 73000                                  | 4,86                   | 3,55    |
| 8                     | Glycyl-tRNA synthétase  | 80000                                  | 4,90                   | 3,15    |
| 9                     | Valyl-tRNA synthétase   | 135000                                 | 5,13                   | 0,00    |

Il est à remarquer que la valyl-tRNA synthétase, molécule de taille trop importante, ne pénètre pas dans le gel.

Cette protéine ne peut donc pas être utilisée pour l'étalonnage.

L'équation de la droite d'étalonnage, établie à partir des données figurant dans le tableau ci-dessus est :

$$d = -12,934 \cdot \log(M_{SU}) + 66,461$$

avec un coefficient de corrélation  $r = 1,000$  !

L'électrophorégramme de la Phe-RS montre la présence de 2 types de sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ).

- Calcul de la masse molaire moléculaire de la sous-unité en position 10 :  $d = 4,15$  cm,  $\log(M_{SU}) = 4,8175$  et  $M_{SU}$  est d'environ 65700 g.mol<sup>-1</sup>.

- Calcul de la masse molaire moléculaire de la sous-unité en position 11:  $d = 3,25$  cm,  $\log(M_{SU}) = 4,8871$  et  $M_{SU}$  est d'environ 77100 g.mol<sup>-1</sup>.

Le densitogramme de l'électrophorégramme de la Phe-RS montre que les 2 types de sous-unités sont présents en nombre équivalent.

Par recouplement avec la gel-filtration, on peut affirmer que la Phe-RS a une structure de type  $\alpha_2\beta_2$ .

**Exercice 7 Séquençage d'un nucléotide**

1. La méthode de Sanger consiste en une synthèse de fragments d'ADN plus ou moins longs, complémentaires de l'ADN simple brin à séquencer. La synthèse est réalisée par l'ADN polymérase I dépourvue d'activité exonucléasique (fragment de Klenow).

- Il faut une amorce double brin pour la mise en place de l'ADN polymérase ;

- les didésoxy-nucléosides triphosphate (ddNTP) bloquent la synthèse, permettant la caractérisation de la base nucléotidique impliquée ;

Hidden page

Hidden page

Hidden page

# 12 - Méthodes optiques

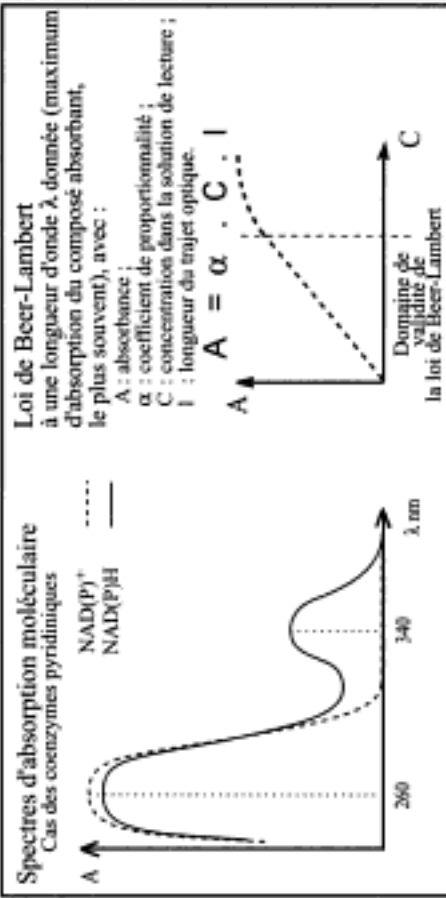
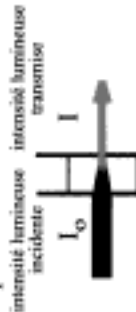
## Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

### 1. Principe

- Les molécules possédant des doubles liaisons absorbent la lumière (d'autant plus que les doubles liaisons sont conjuguées), entre autres, dans les domaines spectraux de l'ultraviolet (UV) proche (200 nm - 400 nm) et dans le visible (400 nm à 750 nm).
- Les molécules acquièrent de l'énergie lors de leur passage d'un état initial dit "fondamental" à divers niveaux d'un état dit "excité" qui est instable.
- Lors du retour à l'état fondamental, il y a perte d'énergie et le plus souvent, dégagement de chaleur (trop faible pour être mesuré).
- L'absorption initiale de lumière peut être quantifiée par deux paramètres :

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad \text{: pourcentage de transmission}$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{: absorbance (grandeur additive)}$$



### 2. Appareillage

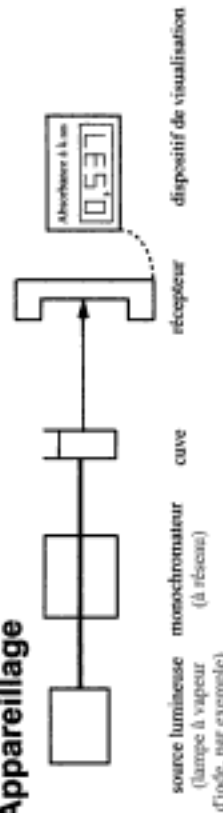


Schéma simplifié d'un spectrophotomètre monofaisceau et monochrome

### 3. Applications

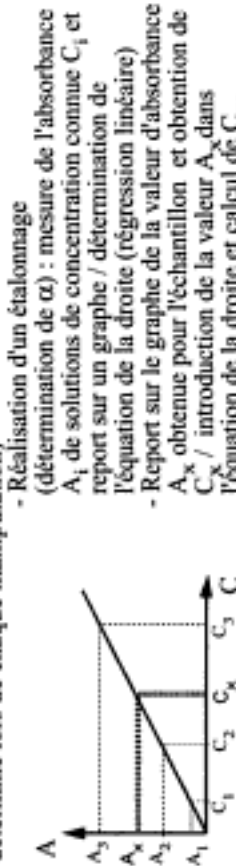
**3.1. Application qualitative :** détermination de spectres en solution pure dans un tampon



A noter : si le maximum d'absorption est à 260 nm, la solution absorbe également à 280 nm et cette absorbance est alors moitié de celle à 260 nm (une valeur entre 1,8 et 2 du rapport  $A_{260}/A_{280}$  est utilisée comme critère de pureté d'une solution d'ADN db).  
Remarque : dans le domaine de l'infrarouge, les spectres obtenus sont constitués d'un grand nombre de pics constituant une sorte d'empreinte caractéristique de la molécule (voir exercice 8).

**3.2. Applications quantitatives :** dosages colorimétriques et spectrophotométriques (application de la loi de Beer - Lambert)

**3.2.1. Avec gamme d'étalonnage** (domaine visible ou parfois UV proche,  $\alpha$  déterminé lors de chaque manipulation)



**3.2.2. Sans gamme d'étalonnage** (domaine UV proche ou parfois visible,  $\alpha$  connu :  $\alpha = \epsilon_M$ , coefficient d'absorption molaire)

$A = \epsilon_M \cdot C \cdot l$  à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée avec :

- A : absorbance (sans unité) ;
- $\epsilon_M$  : coefficient d'absorption molaire souvent exprimé en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$  ;
- C : concentration dans la solution de lecture exprimée en  $mol \cdot L^{-1}$  ;
- l : longueur du trajet optique en cm.

Exemples :

| Substance                           | $\lambda$ , nm | $\epsilon_M$ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------|
| NAD(P) <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> | 340 nm         | 6300                                            |
| 4-aminobiphenyl ou PAP              | 410 nm         | 18500                                           |
| 2-aminohippurate ou OHP             | 410 nm         | 9600                                            |
| 4-aminosalicylate ou PASA           | 410 nm         | 10500                                           |

Une simple mesure d'absorption suffit pour déterminer la concentration (absence d'interférence à la longueur d'onde considérée).

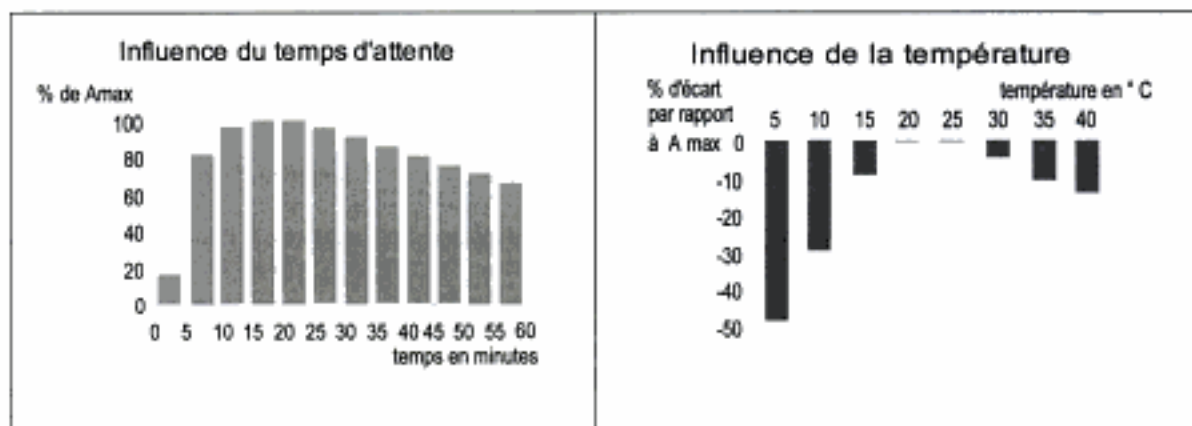
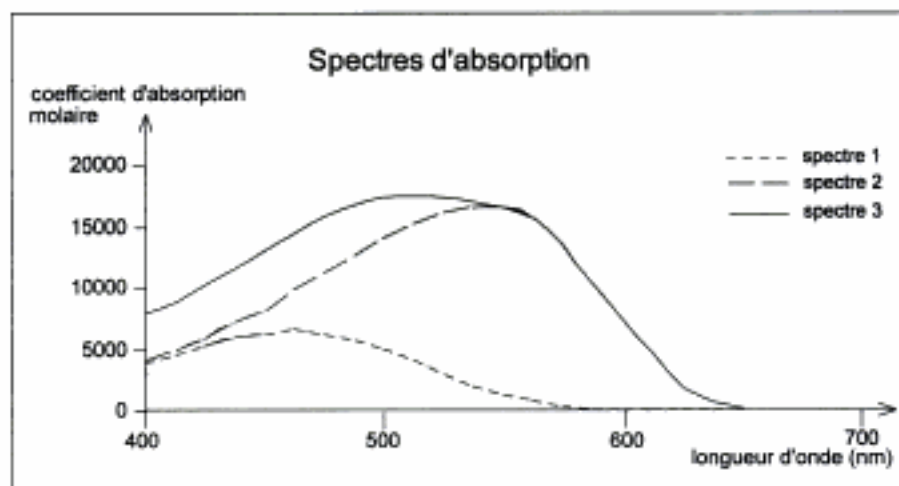
Remarque générale : méthodes bien adaptées aux dosages biochimiques d'où une large utilisation au laboratoire de biochimie.

Hidden page

Hidden page



Hidden page



Commentaires sur les représentations graphiques :

- spectres d'absorption : le " spectre 1 " est le spectre d'absorption du réactif contre l'eau distillée, le " spectre 2 " celui de l'échantillon contre le blanc réactif et le " spectre 3 " celui de l'échantillon contre l'eau distillée ;
- influence du temps d'attente : en ordonnées sont représentées les absorbances en pourcentage de l'absorbance maximale (= 100 %) ;
- influence de la température : en ordonnées sont représentées les absorbances en pourcentage d'écart par rapport à l'absorbance maximale  $A_{max}$  (= 0).

#### Exercice 4 Synthèse d'un analogue structural de l'ATP

On réalise la synthèse chimique d'un analogue de l'ATP ; on obtient 10 mL de solution contenant l'analogue purifié. On veut estimer la quantité d'analogue synthétisé et déterminer son coefficient d'absorption molaire "  $\epsilon$  " dans l'UV à 260 nm.

##### 1. Quantité d'analogue synthétisé

On dose la quantité de phosphore de l'analogue récupéré en mettant en œuvre une technique colorimétrique, misant sur l'interaction du phosphore avec un réactif phosphomolybdique. La dilution de l'analogue, minéralisation comprise, est de 1 / 200 et l'absorbance mesurée à la longueur d'onde d'absorption maximale du complexe coloré obtenu est de 0,510.

Données :

- l'étalonnage de la technique colorimétrique montre qu'une solution de phosphore à une concentration de  $40 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  donne une absorbance égale à 1 ;
- la masse molaire moléculaire de l'analogue structural calculée d'après sa structure chimique est de  $610 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

- 1.1. Comment doit être conduit l'étalonnage par rapport au dosage pour pouvoir utiliser correctement la première donnée ci-dessus ?
- 1.2. Calculer la quantité d'analogue récupéré.

##### 2. Calcul du coefficient d'absorption molaire " $\epsilon$ " à 260 nm de l'analogue structural de l'ATP

L'absorption à 260 nm d'une solution diluée au 1 / 100 de la solution de l'analogue structural est de 0,209. Le trajet optique de la cuve en quartz utilisée est de 1 cm. Calculer le coefficient d'absorption molaire "  $\epsilon$  " à 260 nm de l'analogue structural de l'ATP.

**Exercice 5** Dosage des protéines d'un extrait enzymatique par colorimétrie et spectrophotométrie dans l'UV**1. Dosage des protéines de l'extrait enzymatique par colorimétrie (méthode de Folin-Lowry)**

Le dosage des protéines est fréquent en enzymologie, notamment pour la détermination des activités spécifiques. Ce dosage peut se faire par la méthode de Folin-Lowry. Dans cette technique, les protéines réagissent avec le réactif de Lowry pour donner des complexes colorés. La coloration obtenue est due à la réaction du cuivre alcalin avec les protéines, comme dans le dosage du biuret et à la réduction du réactif phosphomolybdique par la tyrosine et le tryptophane. L'intensité de la coloration est mesurée à 650 nm, 30 minutes après l'addition du réactif de Folin. En enzymologie, l'étalonnage s'effectue classiquement avec la sérumbumine bovine (SAB) ; la technique détecte des quantités de 2 à 200 µg de protéines dans la prise d'essai.

**1.1. Etalonnage**

Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

|                             |       |       |       |       |       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Masse de SAB en µg par tube | 0,00  | 50,0  | 100   | 150   | 200   |
| Absorbance à 650 nm         | 0,000 | 0,097 | 0,191 | 0,283 | 0,374 |

Donner l'équation de la droite d'étalonnage, ainsi que le coefficient de corrélation  $r$ .

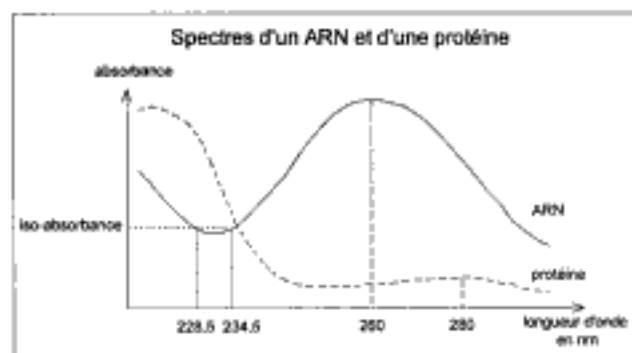
**1.2. Dosage**

Le dosage s'effectue en double exemplaire sur 0,5 mL d'extrait enzymatique. Les absorbances obtenues sont de 0,267 et 0,266.

Calculer la concentration en protéines de l'extrait enzymatique.

**2. Dosage des protéines de l'extrait enzymatique par spectrophotométrie dans l'UV**

Les extraits enzymatiques sont souvent contaminés par des fractions ribonucléiques (ARN). Les protéines ont un maximum d'absorption à 280 nm, ce qui est technologiquement très utilisé, compte tenu de la commodité des mesures à effectuer. Cependant, si l'extrait enzymatique est contaminé par des ARN, la propriété n'est plus utilisable directement. En effet, les ARN ont un pic d'absorption à 260 nm, mais ils absorbent également à 280 nm (voir graphique ci-dessous). La mesure de l'absorbance à 280 nm n'est donc plus le seul fait des protéines présentes en solution.



Une étude plus poussée des spectres d'absorption des ARN et des protéines montre que les ARN possèdent une isoabsorbance à 228,5 et 234,5 nm, alors qu'à ces longueurs d'onde, l'absorption protéique est très différente (voir graphique ci-contre).

Cette propriété peut être mise à profit pour doser les protéines, même en cas de contamination ribonucléique.

2.1. Lors du dosage de protéines en cas de contamination ribonucléique, montrer que si l'on effectue la différence des absorbances ( $\Delta A$ ) mesurées à 228,5 ( $A_1$ ) et 234,5 nm ( $A_2$ ), cette différence ne dépend que de la concentration en protéines.

2.2. Calculer la concentration en protéines de l'extrait enzymatique, sachant que le  $\Delta A$  mesuré est de 0,075 pour l'extrait enzymatique dilué au 1/10.

Donnée : par étalonnage à la SAB, on trouve une concentration en protéines de 317,5 mg.L<sup>-1</sup> pour un  $\Delta A$  de 1.

2.3. Comparer les deux techniques utilisées ainsi que les résultats obtenus.

**Exercice 6** Propriétés spectrales de la tyrosine dans l'UV

La tyrosine, présente dans toutes les protéines, est un acide aminé technologiquement important, compte tenu de son absorption dans le domaine spectral de l'UV. Elle a un maximum d'absorption caractéristique à 280 nm, longueur d'onde usuelle pour l'étude des protéines (voir exercice précédent).

1. On dispose de 2 solutions de tyrosine chacune à une concentration de  $5,0 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, l'une à un pH = 5,65 et l'autre à un pH = 13,0. On mesure l'absorbance de ces 2 solutions à 280 et à 295 nm dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous :

|                     |             |             |
|---------------------|-------------|-------------|
| Solutions           | à pH = 5,65 | à pH = 13,0 |
| Absorbance à 280 nm | 0,700       | 0,580       |
| Absorbance à 295 nm | 0,000       | 1,200       |

1.1. Commenter les résultats obtenus.

1.2. Calculer les différents coefficients d'absorption molaire en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

2. Une solution de tyrosine à  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  dans un tampon à  $\text{pH} = 10,0$  a une absorbance de 0,528 à 295 nm. Calculer  $\text{pK}_{\text{a}}$  de la chaîne latérale de la tyrosine.

Donnée :  $\text{pK}_{\text{a}}$  de la tyrosine (2,2 - 9,1 et 10,1).

### Exercice 7 Essai de modélisation pour l'exploitation des résultats d'une méthode colorimétrique

Les chlorophylles "a" et "b" peuvent être extraites des feuilles des plantes supérieures avec l'acétone sans entraîner les protéines. Elles peuvent ensuite être purifiées par chromatographie d'adsorption. Historiquement, il s'agit d'ailleurs du premier cas de chromatographie (en grec : écriture de la couleur) décrit par la botaniste russe Tswett.

Dans le but d'une étude des photosystèmes de plantes supérieures, on souhaite mettre au point un modèle mathématique satisfaisant permettant de déterminer rapidement les pourcentages en chlorophylle "a" et en chlorophylle "b" au niveau des extraits des feuilles, sans passer par la loi de Beer-Lambert et le système classique de 2 équations à 2 inconnues (pour être plus proche de la réalité expérimentale).

A cet effet, on dispose d'une solution de chlorophylle "a" à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  et une solution de chlorophylle "b" également à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . On mesure les absorbances de ces solutions à 663 nm (un des pics d'absorption de la chlorophylle "a", l'absorption de la chlorophylle "b" n'étant pas négligeable) et à 645 nm (un des pics d'absorption de la chlorophylle "b", l'absorption de la chlorophylle "a" n'étant pas négligeable). On réalise également 3 solutions où l'on mélange les solutions de chlorophylle "a" et "b" dans des proportions connues ; on mesure alors les absorbances de ces solutions à 663 et 645 nm. Les résultats expérimentaux figurent dans le tableau ci-dessous :

| % de chlorophylle "a"             | 100   | 75    | 50    | 25    | 0     |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbance à 663 nm ( $A_{663}$ ) | 0,820 | 0,624 | 0,456 | 0,269 | 0,091 |
| Absorbance à 645 nm ( $A_{645}$ ) | 0,168 | 0,240 | 0,312 | 0,384 | 0,456 |

Remarque : la concentration totale en chlorophylle est égale à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  dans chaque tube.

1. Les représentations  $A_{663}$  ou  $A_{645} = f$  (% de chlorophylle "a") sont des droites. Les pentes des droites obtenues sont toutefois fonction de la concentration totale en chlorophylle et on ne peut utiliser ces représentations pour déterminer le pourcentage en chlorophylle "a" ou "b" dans un extrait quelle que soit la concentration totale en chlorophylle.

Montrer que le paramètre  $k = A_{663} / A_{645}$  n'est pas fonction de la concentration totale en chlorophylle. Calculer  $k$  pour les 5 solutions du tableau ci-dessus.

2. Représenter % de chlorophylle "a" =  $f(k)$  et essayer de trouver une modélisation mathématique satisfaisante en faisant appel à un modèle courant pour le biochimiste.

3. Un extrait chlorophyllien de feuilles de plante supérieure donne les résultats suivants :  $A_{663} = 0,341$  et  $A_{645} = 0,131$ . Déterminer le % de chlorophylle "a" dans l'extrait.

4. Peut-on déterminer les concentrations en chlorophylle "a" et "b" ? Si oui, comment procéder ?

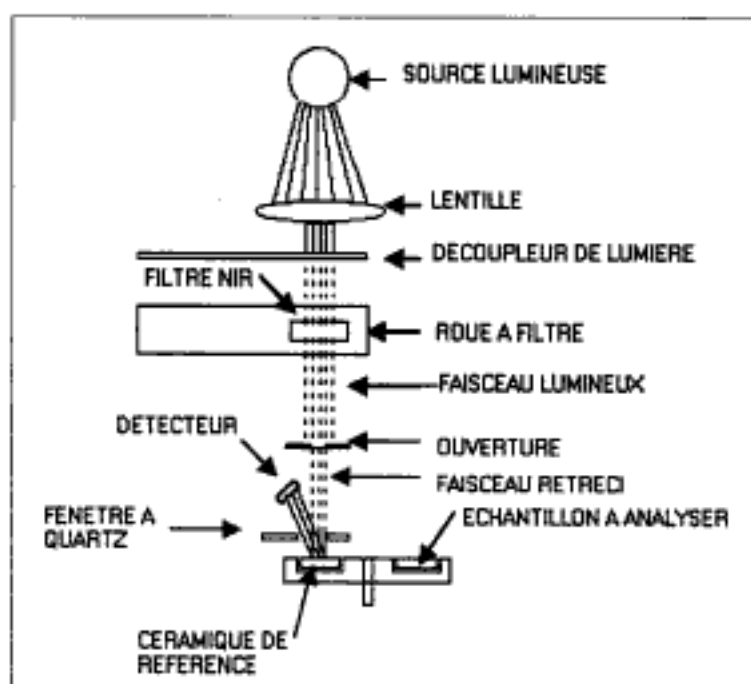
### Exercice 8 Dosage des protéines du lait. Comparaison d'une méthode rapide de dosage par spectrophotométrie dans le domaine spectral de l'infrarouge et de la méthode de référence (méthode de Kjeldahl)

Dans de nombreux laboratoires d'analyses agroalimentaires l'usage est de substituer aux méthodes officielles des méthodes rapides de dosage. En analyse de routine, le dosage des protéines du lait peut être réalisé grâce à des appareils mettant en œuvre la spectrophotométrie dans le domaine spectral de l'infrarouge (IR). Il s'agit de spectres de vibration / rotation, véritables "empreintes digitales" des constituants. L'objet de cet exercice est de présenter cette technologie et de valider l'utilisation de cette méthode rapide de dosage. La validation sera réalisée par comparaison des moyennes des résultats obtenus par chaque méthode grâce à une étude statistique.

#### 1. Présentation de la technologie mise en œuvre pour le dosage rapide

La technologie spectrophotométrique dans le domaine spectral du proche infrarouge permet de déterminer la concentration d'un ou plusieurs constituants d'un échantillon. Il est destiné au contrôle de routine de l'humidité, de la matière sèche, de la matière grasse et de la matière protéique dans différents aliments. De par sa simplicité d'utilisation et sa rapidité d'analyse (quelques secondes), cette technique convient aux analyses en cours de fabrication pour l'optimisation des rendements qualitatifs et quantitatifs, et aux analyses de produits finis pour le contrôle des normes de production.

La technologie spectrophotométrique dans le domaine spectral du proche infrarouge est associée à un traitement statistique pour prédire la concentration d'un constituant dans un échantillon. Des études ont montré que certains constituants absorbent l'énergie des radiations infrarouges à des longueurs d'ondes spécifiques. Par exemple, la matière grasse absorbe à 2,31 et 2,33  $\mu\text{m}$ , les protéines à 2,18  $\mu\text{m}$ . En irradiant un échantillon à des longueurs d'onde spécifiques dans le domaine spectral du proche infrarouge, il est possible de prédire la concentration d'un constituant en mesurant l'énergie qui est réfléchi.



La figure ci-dessus montre le schéma de principe d'un appareil mettant en œuvre la technologie étudiée :

- une lampe halogène au tungstène permet d'obtenir une émission dans le domaine spectral du proche IR ;
- une lentille, localisée sous la lampe, envoie la lumière en rayons parallèles ;
- le faisceau de lumière est interrompu de façon périodique par un découpleur de lumière afin de fournir un signal alternatif au détecteur et ainsi, de faciliter l'amplification ultérieure du signal ;
- la lumière émise par la source passe à travers des filtres proches IR (filtres NIR) qui permettent seulement aux bandes sélectionnées d'exciter l'échantillon ;
- une ouverture fait office de diaphragme et élimine la lumière extérieure pour ne laisser passer que celle qui est filtrée ;
- une partie de la lumière est absorbée par l'échantillon et le reste est réfléchi ;
- un détecteur mesure l'énergie de la lumière réfléchie ;
- l'échantillon est placé dans une coupelle. La répartition de l'échantillon dans la coupelle doit être parfaitement plane et homogène.

## 2. Essais comparatifs

Pour réaliser l'étude comparative, on procède à 30 déterminations de la concentration en protéines d'un lait de référence ( $\rho = 36,50 \text{ g.L}^{-1}$ ) par la méthode rapide de dosage par spectrophotométrie dans le domaine spectral de l'infrarouge et par la méthode de référence (méthode de Kjeldahl).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

| Détermination | Protéines en $\text{g.L}^{-1}$<br>Méthode rapide | Protéines en $\text{g.L}^{-1}$<br>Méthode de référence | Détermination | Protéines en $\text{g.L}^{-1}$<br>Méthode rapide | Protéines en $\text{g.L}^{-1}$<br>Méthode de référence |
|---------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1             | 36,12                                            | 36,46                                                  | 16            | 37,28                                            | 36,98                                                  |
| 2             | 36,30                                            | 36,55                                                  | 17            | 36,30                                            | 36,18                                                  |
| 3             | 35,91                                            | 35,82                                                  | 18            | 36,20                                            | 36,04                                                  |
| 4             | 36,22                                            | 36,11                                                  | 19            | 36,09                                            | 36,05                                                  |
| 5             | 36,26                                            | 36,19                                                  | 20            | 37,32                                            | 37,38                                                  |
| 6             | 36,21                                            | 36,95                                                  | 21            | 36,27                                            | 35,85                                                  |
| 7             | 37,14                                            | 36,35                                                  | 22            | 36,33                                            | 36,09                                                  |
| 8             | 36,37                                            | 36,43                                                  | 23            | 34,80                                            | 36,03                                                  |
| 9             | 36,45                                            | 36,30                                                  | 24            | 34,95                                            | 35,81                                                  |
| 10            | 36,35                                            | 34,00                                                  | 25            | 34,88                                            | 35,84                                                  |
| 11            | 36,10                                            | 37,00                                                  | 26            | 34,85                                            | 35,95                                                  |
| 12            | 37,25                                            | 36,77                                                  | 27            | 36,91                                            | 36,31                                                  |
| 13            | 36,28                                            | 36,10                                                  | 28            | 34,54                                            | 35,56                                                  |
| 14            | 36,13                                            | 36,73                                                  | 29            | 34,54                                            | 36,20                                                  |
| 15            | 36,58                                            | 36,14                                                  | 30            | 36,08                                            | 36,15                                                  |

2.1. Comparer la précision et l'exactitude des deux méthodes étudiées.

2.2. À l'aide du test statistique proposé (*Annexe I*), comparer les moyennes expérimentales obtenues pour les deux méthodes étudiées.

2.3. Est-il possible de substituer la méthode rapide de dosage à la méthode de référence ?

*Annexe 1 Comparaison des moyennes Test de Student*

- Calculer le coefficient " t " du test statistique de Student défini de la manière suivante :

$$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\left(\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}\right)}}$$

avec :  $- s^2 = \frac{\sum(x_A - m_A)^2 + \sum(x_B - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}$  ;

-  $x_A$  et  $x_B$  les valeurs expérimentales ;

-  $m_A$  et  $m_B$  les moyennes des  $n_A$  et  $n_B$  valeurs expérimentales.

- Déterminer la valeur seuil dans la table de Student (*Annexe 2*) en tenant compte de la taille de l'échantillon (n) et du risque  $\alpha$  choisi : 0,05.

- Conclure :

- Si la valeur de " t " du test statistique de Student est inférieure ou égal à la valeur seuil de la table de Student, les moyennes ne sont pas significativement différentes.

- Si la valeur de " t " du test statistique de Student est supérieure à la valeur seuil de la table de Student, les moyennes sont significativement différentes.

*Annexe 2 : Table de la loi de Student*

avec :  $- v = n - 1$

$- P = 1 - (\alpha / 2)$

| $v \backslash P$ | 0,9000 | 0,9500 | 0,9750 | 0,9900 | 0,9950 | 0,9990 | 0,9995 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1                | 3,078  | 6,314  | 12,71  | 31,82  | 63,66  | 318,3  | 636,6  |
| 2                | 1,886  | 2,920  | 4,303  | 6,965  | 9,925  | 22,33  | 31,60  |
| 3                | 1,638  | 2,353  | 3,182  | 4,541  | 5,841  | 10,21  | 12,92  |
| 4                | 1,533  | 2,132  | 2,776  | 3,747  | 4,604  | 7,173  | 8,610  |
| 5                | 1,476  | 2,015  | 2,571  | 3,365  | 4,032  | 5,894  | 6,869  |
| 6                | 1,440  | 1,943  | 2,447  | 3,143  | 3,707  | 5,208  | 5,959  |
| 7                | 1,415  | 1,895  | 2,365  | 2,998  | 3,499  | 4,785  | 5,408  |
| 8                | 1,397  | 1,860  | 2,306  | 2,896  | 3,355  | 4,501  | 5,041  |
| 9                | 1,383  | 1,833  | 2,262  | 2,821  | 3,250  | 4,297  | 4,781  |
| 10               | 1,372  | 1,812  | 2,228  | 2,764  | 3,169  | 4,144  | 4,587  |
| 11               | 1,363  | 1,796  | 2,201  | 2,718  | 3,106  | 4,025  | 4,437  |
| 12               | 1,356  | 1,782  | 2,179  | 2,681  | 3,055  | 3,930  | 4,318  |
| 13               | 1,350  | 1,771  | 2,160  | 2,650  | 3,012  | 3,852  | 4,221  |
| 14               | 1,345  | 1,761  | 2,145  | 2,624  | 2,977  | 3,787  | 4,140  |
| 15               | 1,341  | 1,753  | 2,131  | 2,602  | 2,947  | 3,733  | 4,073  |
| 16               | 1,337  | 1,746  | 2,120  | 2,583  | 2,921  | 3,686  | 4,015  |
| 17               | 1,333  | 1,740  | 2,110  | 2,567  | 2,898  | 3,646  | 3,965  |
| 18               | 1,330  | 1,734  | 2,101  | 2,552  | 2,878  | 3,610  | 3,922  |
| 19               | 1,328  | 1,729  | 2,093  | 2,539  | 2,861  | 3,579  | 3,883  |
| 20               | 1,325  | 1,725  | 2,086  | 2,528  | 2,845  | 3,552  | 3,850  |
| 21               | 1,323  | 1,721  | 2,080  | 2,518  | 2,831  | 3,527  | 3,819  |
| 22               | 1,321  | 1,717  | 2,074  | 2,508  | 2,819  | 3,505  | 3,792  |
| 23               | 1,319  | 1,714  | 2,069  | 2,500  | 2,807  | 3,485  | 3,768  |
| 24               | 1,318  | 1,711  | 2,064  | 2,492  | 2,797  | 3,467  | 3,745  |
| 25               | 1,316  | 1,708  | 2,060  | 2,485  | 2,787  | 3,450  | 3,725  |
| 26               | 1,315  | 1,706  | 2,056  | 2,479  | 2,779  | 3,435  | 3,707  |
| 27               | 1,314  | 1,703  | 2,052  | 2,473  | 2,771  | 3,421  | 3,689  |
| 28               | 1,313  | 1,701  | 2,048  | 2,467  | 2,763  | 3,408  | 3,674  |
| 29               | 1,311  | 1,699  | 2,045  | 2,462  | 2,756  | 3,396  | 3,660  |
| 30               | 1,310  | 1,697  | 2,042  | 2,457  | 2,750  | 3,385  | 3,646  |
| 35               | 1,306  | 1,690  | 2,030  | 2,438  | 2,724  | 3,340  | 3,591  |
| 40               | 1,303  | 1,684  | 2,021  | 2,423  | 2,704  | 3,307  | 3,551  |
| 45               | 1,301  | 1,679  | 2,014  | 2,412  | 2,690  | 3,281  | 3,520  |
| 50               | 1,299  | 1,676  | 2,009  | 2,403  | 2,678  | 3,261  | 3,496  |
| 60               | 1,296  | 1,671  | 2,000  | 2,390  | 2,660  | 3,232  | 3,460  |
| 80               | 1,292  | 1,664  | 1,990  | 2,374  | 2,639  | 3,195  | 3,416  |
| 100              | 1,290  | 1,660  | 1,984  | 2,364  | 2,626  | 3,174  | 3,390  |
| 200              | 1,286  | 1,653  | 1,972  | 2,345  | 2,601  | 3,131  | 3,340  |
| 600              | 1,283  | 1,648  | 1,965  | 2,334  | 2,586  | 3,107  | 3,310  |
| 1000             | 1,282  | 1,646  | 1,962  | 2,330  | 2,581  | 3,098  | 3,300  |
| $\infty$         | 1,282  | 1,645  | 1,960  | 2,326  | 2,576  | 3,090  | 3,290  |

## Emission moléculaire

## Exercice 9 Dosage de la quinine dans une boisson gazeuse ("Tonic")

## 1. Dosage de la quinine par spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'UV

L'amertume de la boisson gazeuse provient de la présence de la quinine ajoutée à faible concentration. La quinine absorbe dans l'UV avec un maximum d'absorption à 320 nm. Cette propriété peut être mise à profit pour doser la quinine dans la boisson gazeuse.

L'étalonnage du spectrophotomètre s'effectue à partir d'une solution étalon de quinine à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . A partir de cette solution étalon, on réalise des dilutions (dans l'eau distillée) en cascade de raison  $2/3$  et on lit les absorbances correspondantes à 320 nm, contre l'eau distillée. Le 0 du spectrophotomètre est réglé sur l'eau distillée.

Le dosage s'effectue sur 2 dilutions au  $1/2$  de tonic dégazéifié ( $D_1$  et  $D_2$ ).

Les différentes absorbances "A" obtenues pour l'étalonnage et pour les deux dosages figurent dans le tableau ci-dessous :

|                                    |       |             |               |               |               |               |       |       |
|------------------------------------|-------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|-------|
| [quinine]<br>en $\text{mg.L}^{-1}$ | 100   | $100.(2/3)$ | $100.(2/3)^2$ | $100.(2/3)^3$ | $100.(2/3)^4$ | $100.(2/3)^5$ | $D_1$ | $D_2$ |
| "A"<br>à 320 nm                    | 1,670 | 1,105       | 0,736         | 0,492         | 0,337         | 0,221         | 0,586 | 0,582 |

1.1. Donner l'équation de la droite d'étalonnage "A" = f([quinine]), ainsi que le coefficient de corrélation correspondant.

1.2. Calculer la concentration en quinine du tonic étudié en  $\text{mg.L}^{-1}$  (on suppose que la quinine est le seul composé qui absorbe à 320 nm).

1.3. Calculer le coefficient d'absorption spécifique "a" de la quinine à 320 nm en  $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

## 2. Dosage de la quinine par fluorimétrie

La quinine en solution dans l'acide sulfurique dilué (1 %) présente une fluorescence à 450 nm à la suite d'une excitation à 320 nm. La fluorescence F émise dans une direction donnée de l'espace est proportionnelle à l'énergie absorbée par la quinine. On peut écrire la relation suivante :

$$F = k \cdot (I_0 - I) \quad (\text{équation 1})$$

équation où  $I_0$  représente l'énergie incidente et I l'énergie transmise.



Energie absorbée par la quinine :  
( $I_0 - I$ )

## 2.1. Expression de la fluorescence F en fonction de la concentration C

Démontrer l'expression suivante :

$$F = k \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon \cdot l \cdot C})$$

où  $\epsilon$  est le coefficient d'absorption spécifique de la quinine à 320 nm (voir question 1.3)

et  $l$  est la longueur du trajet optique de la cuve de mesure.

## 2.2. Proportionnalité entre F et C

En fluorimétrie, on considère qu'il y a proportionnalité entre F et C.

Le terme  $10^{-\epsilon \cdot l \cdot C}$  de l'équation 1 donne lieu à des séries du type :  $1 - 2,3 \cdot a \cdot l \cdot C$  avec en plus des termes négligeables pour de faibles concentrations. Dans ce cas, on peut écrire  $F = 2,3 \cdot k \cdot I_0 \cdot a \cdot l \cdot C$  (proportionnalité entre F et C).

Vérification de la proportionnalité : la fluorescence d'une solution de quinine à  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  en milieu sulfurique est de 80 unités arbitraires (ua). Compléter le tableau suivant :

|                                                        |      |     |     |     |
|--------------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|
|                                                        | 0,2  | 0,5 | 1   | 2   |
| Valeurs de F attendues si F est proportionnel à C (ua) | 80   | 200 | 400 | 800 |
| Valeurs de F calculées à partir de l'équation 1 (ua)   | 80   |     |     |     |
| % d'écart entre valeurs attendues et valeurs calculées | 0,00 |     |     |     |

Hidden page



Hidden page

## 2.2. Constante d'équilibre de la réaction catalysée par la glucose isomérase

Après 24 h de réaction entre la solution de glucose et la glucose isomérase, le pouvoir rotatoire est stabilisé à une valeur de  $-7,040^\circ$ .

En déduire la valeur de la constante d'équilibre de la réaction.

**Exercice 13** Etude de la structure secondaire des polypeptides par dispersion rotatoire optique

Le pouvoir rotatoire, résultant d'une asymétrie moléculaire, permet également l'étude de structures asymétriques hélicoïdales du type de celles rencontrées dans les polypeptides.

Le pouvoir rotatoire des polypeptides dépend du taux d'hélicité existant ainsi que des acides aminés optiquement actifs. En faisant la part de chacun de ces 2 facteurs responsables du pouvoir rotatoire, il est possible de déterminer un taux d'hélicité inconnu pour un polypeptide donné et donc d'avoir une indication sur sa structure secondaire dans un milieu donné.

La modélisation de la variation du pouvoir rotatoire (dispersion rotatoire optique) en fonction de la longueur d'onde d'étude a pour équation :

$$(m)_\lambda = a_0 \cdot \lambda_0^2 / (\lambda^2 - \lambda_0^2) + b_0 \cdot \lambda_0^4 / (\lambda^2 - \lambda_0^2)^2$$

expression où :

- $(m)_\lambda$  est la rotation résiduelle moyenne réduite (fonction de l'angle de rotation  $\alpha$ ) ;
- $\lambda$  est la longueur d'onde de mesure ;
- $\lambda_0$  est la longueur d'onde d'absorption du chromophore (212 nm pour les polypeptides) ;
- $a_0$  et  $b_0$  sont des constantes. La constante  $b_0$  est la seule des 2 constantes à ne dépendre que des interactions au niveau de l'hélice.

Dans le but de systématiser l'étude des polypeptides, on réalise une étude sur un polypeptide de synthèse, le polyglutamate comportant 5 % de tyrosine, ceci dans 2 cas de figure :

- dans un tampon à pH = 3 ;
- dans un tampon à pH = 7.

1. La représentation graphique proposée pour la résolution de l'exercice est la suivante :

$$(m)_\lambda \cdot (\lambda^2 - \lambda_0^2) / \lambda_0^2 = f(\lambda_0^2 / (\lambda^2 - \lambda_0^2))$$

Cette représentation est une droite si le polypeptide répond au modèle proposé. Comment déterminer alors la constante  $b_0$  caractéristique des interactions au niveau de l'hélice ?

2. Pour chiffrer la constante  $b_0$ , une étude est effectuée sur le polypeptide de synthèse entre 300 et 500 nm. Les résultats obtenus pour le polypeptide figurent dans le tableau ci-dessous :

| $(\lambda_0^2 / (\lambda^2 - \lambda_0^2))$ | $(m)_\lambda \cdot (\lambda^2 - \lambda_0^2) / \lambda_0^2$<br>à pH = 3 | $(m)_\lambda \cdot (\lambda^2 - \lambda_0^2) / \lambda_0^2$<br>à pH = 7 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1,0                                         | - 700                                                                   | - 750                                                                   |
| 0,9                                         | - 635                                                                   | - 745                                                                   |
| 0,8                                         | - 575                                                                   | - 740                                                                   |
| 0,7                                         | - 510                                                                   | - 735                                                                   |
| 0,6                                         | - 450                                                                   | - 730                                                                   |
| 0,5                                         | - 380                                                                   | - 725                                                                   |
| 0,4                                         | - 320                                                                   | - 720                                                                   |
| 0,3                                         | - 260                                                                   | - 715                                                                   |

2.1. Pour l'un des pH d'étude, on a le polypeptide à 100 % sous forme d'hélice  $\alpha$  ; pour l'autre pH, on a le polypeptide à 100 % sous forme désordonnée. A quel pH a-t-on la forme hélicoïdale ? La forme désordonnée ? Justifier la réponse.

2.2. Calculer le paramètre  $b_0$  dans chaque cas. Comment déterminer le taux d'hélicité pour un polypeptide inconnu,  $b_0$  variant toujours linéairement en fonction du taux d'hélicité entre les valeurs extrêmes trouvées précédemment ?

2.3. Un polypeptide donné riche en Glu et en Pro donne un faible taux d'hélicité de l'ordre de 15 %. Comment expliquer ce résultat ?

## Corrigés des exercices

### Exercice 1 Absorption moléculaire d'une solution de permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>)

#### 1. Choix de la longueur d'onde de travail

On réalise le spectre d'absorption (Absorbance = f (longueur d'onde)) d'une solution de KMnO<sub>4</sub> dans le domaine spectral du visible. La longueur d'onde de travail choisie est celle où l'absorbance mesurée est maximale. A cette longueur d'onde, il y a la meilleure sensibilité expérimentale.

#### 2. Calcul de " C " et de " ρ "

On applique la loi de Beer-Lambert :  $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ , d'où  $C = A / (\varepsilon \cdot l)$ .

$$C = 0,540 / 216 \cdot 1 \cdot 10^{-2} = 0,250 \text{ mol.m}^{-3}, \text{ soit } 0,250 \cdot 10^{-3} \text{ ou } 2,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$\rho = C \cdot M, \text{ d'où } \rho = 2,50 \cdot 10^{-4} \cdot 158 = 3,95 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$$

#### 3. Calcul de la transmittance " T "

La relation entre l'absorbance A et la transmittance T est :  $A = \log (1/T)$ , d'où  $T = 1 / 10^A$ .

$$T = 1 / 10^{0,540} = 0,288 \text{ soit } 28,8 \%$$

#### 4. Calcul de la concentration molaire C<sub>i</sub> de l'impureté.

La loi de Beer-Lambert est une loi additive. La différence d'absorbance (A' - A) correspond donc à l'absorbance liée à l'impureté.

$C_i = (A' - A) / (\varepsilon_i \cdot l)$  où  $\varepsilon_i$  est le coefficient d'absorption molaire de l'impureté

$$C_i = (0,544 - 0,540) / (100 \cdot 1 \cdot 10^{-2}) = 4,00 \cdot 10^{-2} \text{ mol.m}^{-3} = 4,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

### Exercice 2 Dosage d'un mélange de nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD<sup>+</sup>) et réduit (NADH)

On applique la loi de Beer-Lambert pour les absorbances obtenues à 260 et 340 nm :

- à 260 nm, on peut calculer la concentration totale en nucléotides, étant donné que :

$$\varepsilon_{\text{NAD}^+} = \varepsilon_{\text{NADH}} = 18,0 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Donc,  $A = 1 = 18,0 \cdot 10^3 \cdot 1 \cdot ([\text{NAD}^+] + [\text{NADH}])$ .

La résolution de l'équation donne :

$$[\text{NAD}^+] + [\text{NADH}] = 1 / (18,0 \cdot 10^3 \cdot 1) = 5,56 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

- à 340 nm, on a la [NADH] puisque NAD<sup>+</sup> n'absorbe pas. On a :

$$0,189 = 6,3 \cdot 10^3 \cdot 1 \cdot [\text{NADH}], \text{ d'où } [\text{NADH}] = 0,189 / 6,3 \cdot 10^3 = 3,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$[\text{NAD}^+] = 5,56 \cdot 10^{-5} - 3,00 \cdot 10^{-5} = 2,56 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

### Exercice 3 Dosage colorimétrique du calcium, choix des conditions du dosage

L'examen des représentations graphiques permet de préciser les conditions optimales de mesure de la coloration obtenue :

- spectres d'absorption : le spectre " 1 " montre que le blanc réactif absorbe dans le visible. La longueur d'onde la plus favorable pour une meilleure sensibilité du dosage est celle où la différence d'absorbance entre l'échantillon et le blanc réactif est la plus importante. C'est donc le spectre " 2 " et non le spectre " 3 " qui est à prendre en considération. Le coefficient d'absorption molaire à retenir  $\varepsilon_{\text{max}}$  peut être estimé ici à 17000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour une longueur d'onde d'environ 550 nm ;
- influence du temps d'attente : le temps d'attente le plus favorable se situe entre 20 et 25 minutes ;
- influence de la température : la température la meilleure se situe entre 20 et 25 °C.

La concentration en calcium [Ca<sup>2+</sup>] du vin à tester s'obtient par application de la loi de Beer-Lambert :

$$\text{on a, } A = \varepsilon \cdot l \cdot [\text{Ca}^{2+}], \text{ soit } [\text{Ca}^{2+}] = A / (\varepsilon \cdot l)$$

Dans le milieu de lecture,  $[\text{Ca}^{2+}] = 0,340 / (17000 \cdot 1)$

Compte tenu du fait que le vin est dilué lors du dosage (0,1 mL dans un volume final de  $0,1 + 5 + 4 \cdot 0,05 + 4 \cdot 0,05$  soit 5,5 mL), dans l'échantillon, on a  $[Ca^{2+}] = 0,340 \cdot 5,5 / (17000 \cdot 1 \cdot 0,1) = 1,10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Cela représente une concentration massique  $\rho = 1,10 \cdot 10^{-3} \cdot 40 = 4,40 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ , soit  $44,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

La concentration en calcium est donc conforme à la valeur souhaitée.

#### Exercice 4 Synthèse d'un analogue structural de l'ATP

##### 1. Quantité d'analogue synthétisé

1.1. Il n'y a pas d'indication particulière sur la manière de conduire le dosage colorimétrique. Classiquement dans les colorimétries, les volumes de réactifs et les volumes totaux sont les mêmes pour étalons et dosages. Dosage(s) et étalon(s) sont effectués simultanément et dans les mêmes conditions. La concentration de phosphore de  $40 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  doit être comprise ici comme étant la concentration de l'étalon avant addition des réactifs nécessaires au développement de la coloration.

La concentration en phosphore notée [P] de la solution de l'analogue s'obtient par un simple calcul de proportionnalité (produit en croix) en tenant compte de la dilution au 1/200, soit :

$$[P] = 0,510 \cdot 40 \cdot 10^{-6} \cdot 200 / 1 = 4,08 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

On en déduit la concentration en analogue notée [analogue], compte tenu qu'une mole d'analogue de l'ATP comporte 3 moles de phosphore. On a :

$$[\text{analogue}] = 4,08 \cdot 10^{-3} / 3 = 1,36 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

1.2. La quantité d'analogue obtenu dans les 10 mL de solution est :

$$1,36 \cdot 10^{-3} \cdot 610 \cdot 10 \cdot 10^{-3} = 8,296 \cdot 10^{-3} \text{ g soit environ } 8,3 \text{ mg}$$

##### 2. Calcul du coefficient d'absorption molaire noté " $\epsilon$ " à 260 nm de l'analogue structural de l'ATP

La solution en analogue est diluée au 1/100 avant mesure, sa concentration notée [analogue dilué] est égale à  $(1,36 \cdot 10^{-3} / 100) \text{ mol.L}^{-1}$ .

On applique la loi de Beer-Lambert à la solution diluée :  $A$  à 260 nm =  $\epsilon \cdot l \cdot [\text{analogue dilué}]$ , d'où  $\epsilon = A$  à 260 nm / ( $l \cdot [\text{analogue dilué}]$ ). On a :  $\epsilon = 0,209 \cdot 100 / (1,36 \cdot 10^{-3} \cdot 1) = 15400 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### Exercice 5 Dosage des protéines d'un extrait enzymatique par colorimétrie et spectrophotométrie dans l'UV

##### 1. Dosage des protéines d'un extrait enzymatique par colorimétrie (méthode de Folin-Lowry)

###### 1.1. Etalonnage

L'équation de la droite d'étalonnage est  $A = 0,001868 \cdot q + 0,0022$  où  $A$  est l'absorbance mesurée à 650 nm et  $q$  la quantité de protéines dans les tubes de dosage. Le coefficient de corrélation  $r = 0,9999$ .

###### 1.2. Dosage

Les quantités de protéines pour les dosages  $q_1$  et  $q_2$  sont respectivement de 142 et 141  $\mu\text{g}$  pour 0,5 mL de prise d'essai, soit une concentration moyenne en protéines de  $283 \text{ mg.L}^{-1}$ .

##### 2. Dosage des protéines d'un extrait enzymatique par spectrophotométrie dans l'UV

2.1. La loi de Beer-Lambert est additive. Il convient d'écrire la loi de Beer-Lambert pour les mesures à 228,5 nm ( $\lambda_1$ ) et à 234,5 nm ( $\lambda_2$ ).

- pour la longueur d'onde  $\lambda_1$ , on a :

$$A_1 = \epsilon_{1\text{ARN}} \cdot l \cdot c_{\text{ARN}} + \epsilon_{1\text{P}} \cdot l \cdot c_{\text{P}}$$

où  $\epsilon_{1\text{ARN}}$  et  $\epsilon_{1\text{P}}$  sont respectivement les coefficients d'absorption molaire des ARN et des protéines à la longueur d'onde  $\lambda_1$ ,  $c_{\text{ARN}}$  et  $c_{\text{P}}$  respectivement les concentrations en ARN et protéines.

- pour la longueur d'onde  $\lambda_2$ , on a :

$$A_2 = \epsilon_{2\text{ARN}} \cdot l \cdot c_{\text{ARN}} + \epsilon_{2\text{P}} \cdot l \cdot c_{\text{P}}$$

$$\Delta A = A_1 - A_2 = (\epsilon_{1\text{ARN}} \cdot l \cdot c_{\text{ARN}} + \epsilon_{1\text{P}} \cdot l \cdot c_{\text{P}}) - (\epsilon_{2\text{ARN}} \cdot l \cdot c_{\text{ARN}} + \epsilon_{2\text{P}} \cdot l \cdot c_{\text{P}})$$

Comme il y a isoabsorbance pour les ARN à 228,5 et 234,5 nm, on en déduit que :

$$\epsilon_{1\text{ARN}} = \epsilon_{2\text{ARN}} \text{ d'où } (\epsilon_{1\text{ARN}} \cdot l \cdot c_{\text{ARN}} - \epsilon_{2\text{ARN}} \cdot l \cdot c_{\text{ARN}}) = 0. \text{ Donc } \Delta A = \epsilon_{1\text{P}} \cdot l \cdot c_{\text{P}} - \epsilon_{2\text{P}} \cdot l \cdot c_{\text{P}} = c_{\text{P}} \cdot l \cdot (\epsilon_{1\text{P}} - \epsilon_{2\text{P}})$$

Les coefficients d'absorption molaires  $\epsilon_{1\text{P}}$  et  $\epsilon_{2\text{P}}$  sont des constantes,  $l$  est en général égal à 1 cm, donc  $\Delta A$  ne dépend que de la concentration en protéines.

2.2. Pour  $\Delta A = 1$ , on a une concentration en protéines de  $317,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , donc pour une solution protéique diluée au 1/10 avec un  $\Delta A = 0,075$  on a une concentration en protéines de :  $0,075 \cdot 10 \cdot 317,5 / 1 = 238 \text{ mg.L}^{-1}$ .

2.3. Les résultats obtenus par les 2 méthodes sont assez différents (17 % d'écart). La spectrophotométrie dans l'UV ne s'intéresse qu'aux acides aminés aromatiques constitutifs de la protéine, alors que le principe de la méthode de Folin-Lowry est plus complexe (voir détails dans l'énoncé).

Il est clair que la facilité de mise en œuvre plaide pour la spectrophotométrie dans l'UV ; on obtient un résultat rapidement à partir d'une simple dilution adéquate de la solution protéique. Il faut néanmoins que le spectrophotomètre utilisé soit de bonne qualité ; la longueur d'onde doit être définie à 0,5 nm près.

### Exercice 6 Propriétés spectrales de la tyrosine dans l'UV

#### 1. Absorption de la tyrosine dans l'UV

##### 1.1. Commentaire des résultats obtenus.

La tyrosine à pH = 5,65 est à 100 % sous sa forme isoélectrique (voir chapitre sur les acides aminés). Elle a un maximum d'absorption à 280 nm, mais n'absorbe pas à 295 nm.

La tyrosine à pH = 13,0 est à 100 % sous la forme  $\text{Tyr}^{2-}$  (voir chapitre sur les acides aminés). Elle absorbe moins que précédemment à 280 nm, mais un nouveau pic d'absorption apparaît à 295 nm.

L'explication se trouve au niveau de la chaîne latérale de la tyrosine. Le groupement phénol ( $\phi\text{-OH}$ ) de la chaîne latérale devient  $\phi\text{-O}^-$  en milieu alcalin. La délocalisation électronique s'amplifie, la conjugaison au niveau de la molécule est plus importante et provoque cet effet "hyperchrome".

##### 1.2. Calcul des différents coefficients d'absorption molaire en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Le calcul s'effectue à partir de la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c, \text{ d'où } \epsilon = A / (l \cdot c)$$

Les résultats obtenus, après calcul, figurent dans le tableau ci-dessous :

| Solutions                                                                         | à pH = 5,65 | à pH = 13,0 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| Coefficients d'absorption molaire à 280 nm ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) | 1400        | 1160        |
| Coefficients d'absorption molaire à 295 nm ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) | 0           | 2400        |

#### 2. Calcul du $\text{pK}_{\text{aR}}$ de la chaîne latérale de la tyrosine.

A pH = 10,0 il y a un mélange des formes  $\text{Tyr}^-$  et  $\text{Tyr}^{2-}$  (voir chapitre sur les acides aminés). Seule la forme  $\text{Tyr}^{2-}$  absorbe à 295 nm et il est donc possible de calculer sa concentration  $[\text{Tyr}^{2-}]$ .

$$[\text{Tyr}^{2-}] = 0,528 / 2400 = 2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

De plus, on a  $[\text{Tyr}^{2-}] + [\text{Tyr}^-] = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (conservation de la matière). On en déduit :

$$[\text{Tyr}^-] = 5,0 \cdot 10^{-4} - 2,2 \cdot 10^{-4} = 2,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

Le  $\text{pK}_{\text{aR}}$  de la chaîne latérale de la tyrosine s'obtient par l'équation de Henderson-Hasselbalch :

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pK}_{\text{aR}} + \log ([\text{Tyr}^{2-}] / [\text{Tyr}^-]) \\ \text{d'où } \text{pK}_{\text{aR}} &= \text{pH} - \log ([\text{Tyr}^{2-}] / [\text{Tyr}^-]) \\ \text{pK}_{\text{aR}} &= 10 - \log (2,2 \cdot 10^{-4} / 2,8 \cdot 10^{-4}) = 10,1 \end{aligned}$$

Cette valeur est égale à la valeur de  $\text{pK}_{\text{aR}}$  donnée par l'énoncé.

### Exercice 7 Essai de modélisation pour l'exploitation des résultats d'une méthode colorimétrique

1. Pour simplifier, la chlorophylle "a" est symbolisée par "a" et la chlorophylle "b" par "b". Les concentrations des deux composés sont respectivement symbolisées par [a] et [b].

L'absorbance obtenue à partir de la loi de Beer-Lambert s'écrit :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Cette loi étant additive, il est possible d'écrire pour l'absorbance ( $A_{663}$ ) d'un mélange de "a" et de "b" à 663 nm :

$$A_{663} = \alpha_{663} \cdot l \cdot [a] + \beta_{663} \cdot l \cdot [b]$$

où  $\alpha_{663}$  et  $\beta_{663}$  sont respectivement les coefficients d'absorption spécifiques (exprimées en  $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) des chlorophylles "a" et "b" à 663 nm.

Hidden page

Hidden page

## 2. Dosage de la quinine par fluorimétrie

## 2.1. Expression de la fluorescence " F " en fonction de la concentration " C "

On part de l'équation 1,

$$F = k \cdot (I_0 - I)$$

La loi de Beer-Lambert sur l'absorption moléculaire A s'écrit :

$$A = \log (I_0 / I) = a \cdot l \cdot C$$

On en déduit que  $I = I_0 \cdot 10^{-a \cdot l \cdot C}$ .

L'équation 1 devient :

$$F = k \cdot (I_0 - I) = k \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-a \cdot l \cdot C})$$

## 2.2. Proportionnalité entre F et C

La fluorescence (80 UA) de la solution de quinine à  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  ou  $0,0002 \text{ g.L}^{-1}$  permet de calculer le terme constant  $k \cdot I_0$ . On a la relation suivante :

$$80 = k \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-36,63 \cdot 1 \cdot 0,0002})$$

L'application numérique conduit à  $k \cdot I_0 = 10486$ . Il est maintenant possible de calculer les fluorescences des autres solutions prévues et de compléter le tableau de l'énoncé :

| [quinine] en $\text{mg.L}^{-1}$                        | 0,2  | 0,5  | 1    | 2    |
|--------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Valeurs de F attendues si F est proportionnel à C (UA) | 80   | 200  | 400  | 800  |
| Valeurs de F calculées à partir de l'équation 1 (UA)   | 80   | 199  | 394  | 773  |
| % d'écart entre valeurs attendues et valeurs calculées | 0,00 | 0,50 | 1,51 | 3,43 |

L'écart entre les valeurs attendues et les valeurs calculées augmente avec la concentration de la solution fluorescente. Il est confirmé que la proportionnalité entre F et C n'est valable que pour de faibles concentrations.

## 2.3. Dosage de la quinine dans le tonic

La représentation  $F = f(C)$  a pour équation :

$$F = 386,15 \cdot C + 3,4475$$

si on l'assimile à une droite (ce qui se justifie puisque  $r = 0,9999$ ). A une fluorescence de 460 UA correspond une concentration en quinine de  $1,1823 \text{ mg.L}^{-1}$ . Le tonic étant dilué au 1 / 50, sa concentration en quinine est de  $1,1823 \cdot 50$ , soit environ  $59,1 \text{ mg.L}^{-1}$ .

En prenant la modélisation rigoureuse, on obtient environ  $58,6 \text{ mg.L}^{-1}$ , soit un écart de 0,8 %. Il est à noter que le fait d'effectuer un étalonnage sur plusieurs solutions minimise cet écart. En effet, avec l'étalon à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de quinine qui donne une fluorescence de 400 UA (proche de celle du dosage), l'écart est de 1,51 %.

## 3. Comparaison des deux méthodologies utilisées pour doser la quinine, ainsi que les résultats expérimentaux obtenus :

- La méthode fluorimétrique permet de détecter des concentrations plus faibles (cf : dilutions du tonic effectuées) et possède une meilleure spécificité (2 longueurs d'onde utilisées contre une seule pour la spectrophotométrie). On ne peut toutefois se prononcer sur la qualité des résultats obtenus.
- Il y a un écart d'environ 18 % au niveau du résultat final. Cela s'explique, peut-être, par la présence dans le tonic d'une autre substance absorbant à 320 nm, donc d'un manque de spécificité éventuel au niveau de la méthode spectrophotométrique.

Exercice 10 Dosage du plomb dans un lot de saccharose par spectrophotométrie d'absorption atomique (SPAA)

## 1. Etalonnage du spectrophotomètre d'absorption atomique

1.1. La lampe du spectrophotomètre possède une cathode creuse renfermant du plomb. Lors de la mise sous tension de l'appareil, il y a excitation des électrons périphériques du plomb, suivie d'une désexcitation avec émission d'une radiation électromagnétique à 283,3 nm. Cette radiation est absorbée par le plomb (sous forme de vapeur atomique) de la solution à doser, conformément à la loi de Kirchoff.

## 1.2. Extraction du plomb

La solution mère à préparer à partir de nitrate de plomb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) est à 1 g de plomb par litre d'eau distillée. La masse de nitrate de plomb à peser pour préparer 1 L. de solution mère est :  $331,21 \cdot 1 / 207,2 = 1,5985 \text{ g}$ .



Hidden page

La pente de la droite correspond à une variation du pouvoir rotatoire pour une variation d'une concentration en glucose de 1 % (m/V), soit  $10 \text{ g.L}^{-1}$  ou encore  $10^{-2} \text{ g.mL}^{-1}$ .

$$[\alpha_G]_D^{20} = \alpha / (l \cdot [G]), \text{ d'où } [\alpha_G]_D^{20} = 1,0934 / (2 \cdot 10^{-2}) = 54,67 \text{ }^\circ\text{.dm}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{.mL}$$

### 1.2. Cas du fructose

Le mode de résolution est identique à ce qui précède.

La représentation  $\alpha = f([F])$  est une droite d'équation

$$\alpha = -1,969 \cdot [F] + 1,03$$

avec un coefficient de corrélation  $r = -0,9995$

$$[\alpha_F]_D^{20} = \alpha / (l \cdot [F]), \text{ d'où } [\alpha_F]_D^{20} = -1,969 / (2 \cdot 10^{-2}) = -98,45 \text{ }^\circ\text{.dm}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{.mL}$$

## 2. Applications

### 2.1. Activité spécifique de la glucose isomérase

- Dans un premier temps, il est possible (par exemple) de calculer la concentration en fructose au bout de 20 minutes (cette concentration en fructose correspond d'ailleurs à la concentration du glucose consommé, que cette concentration soit exprimée en  $\text{mol.L}^{-1}$  ou en  $\text{g.L}^{-1}$ ). A partir du calcul de cette concentration, on en déduit l'activité spécifique de l'enzyme.

Le pouvoir rotatoire au temps 0 minute  $\alpha_0$  s'écrit :  $\alpha_0 = [\alpha_G]_D^{20} \cdot l \cdot [G_0]$  où  $[G_0]$  est la concentration initiale en glucose.

La loi de Biot est une loi additive. Le pouvoir rotatoire au temps 20 minutes  $\alpha_{20}$  s'écrit :

$$\alpha_{20} = [\alpha_G]_D^{20} \cdot l \cdot [G_{20}] + [\alpha_F]_D^{20} \cdot l \cdot [F_{20}]$$

où  $[G_{20}]$  et  $[F_{20}]$  sont respectivement les concentrations en glucose et en fructose au bout de 20 minutes de réaction.

$$\alpha_0 - \alpha_{20} = ([\alpha_G]_D^{20} \cdot l \cdot [G_0] - [\alpha_G]_D^{20} \cdot l \cdot [G_{20}]) - ([\alpha_F]_D^{20} \cdot l \cdot [F_{20}]) = ([\alpha_G]_D^{20} \cdot l \cdot ([G_0] - [G_{20}])) - ([\alpha_F]_D^{20} \cdot l \cdot [F_{20}])$$

Or  $([G_0] - [G_{20}]) = [F_{20}]$ ,

donc  $\alpha_0 - \alpha_{20} = ([\alpha_G]_D^{20} \cdot l \cdot [F_{20}]) - ([\alpha_F]_D^{20} \cdot l \cdot [F_{20}]) = [F_{20}] \cdot (l \cdot ([\alpha_G]_D^{20} - [\alpha_F]_D^{20}))$

$$[F_{20}] = (\alpha_0 - \alpha_{20}) / (l \cdot ([\alpha_G]_D^{20} - [\alpha_F]_D^{20}))$$

$$[F_{20}] = (42,160 - 40,395) / (2 \cdot (54,67 + 98,45)) = 0,005763 \text{ g.mL}^{-1} \text{ ou } 5,763 \text{ g.L}^{-1}$$

- Calcul de l'activité spécifique de l'enzyme (voir également le chapitre sur l'enzymologie).

$$[F_{20}] = 5,763 \text{ g.L}^{-1} \text{ ou encore } 5,763 / 180 = 3,202 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$$

La durée de réaction est de 20 min, le volume de milieu réactionnel est de 15,70 mL, la masse d'enzyme utilisé de 10 mg, donc l'activité spécifique en  $\text{U.mg}^{-1}$  d'enzyme est :  $3,202 \cdot 10^{-2} \cdot 10^6 \cdot 15,70 \cdot 10^{-3} / (20 \cdot 10) = 2,51 \text{ U.mg}^{-1}$ .

### 2.2. Constante d'équilibre de la réaction catalysée par la glucose isomérase

Le même type de calcul que précédemment permet d'obtenir la concentration finale en fructose  $[F_f]$ .

$$[F_f] = (42,160 - (-7,040)) / (2 \cdot (54,67 + 98,45)) = 0,3213 \text{ g.mL}^{-1}$$

ou  $0,3213 \cdot 10^3 / 180 = 1,785 \text{ mol.L}^{-1}$

La concentration initiale en glucose  $[G_0]$  est donnée par la loi de Biot :

$$[G_0] = \alpha_0 / (l \cdot [\alpha_G]_D^{20})$$

$$[G_0] = 42,160 / (2 \cdot 54,67) = 0,3856 \text{ g.mL}^{-1}$$

ou  $0,3856 \cdot 10^3 / 180 = 2,142 \text{ mol.L}^{-1}$

La concentration finale en glucose  $[G_f]$  est donc de  $2,142 - 1,785 = 0,357 \text{ mol.L}^{-1}$ .

La constante d'équilibre

$$K = [F_f] / [G_f] \text{ est } K = 1,785 / 0,357 = 5$$

L'équilibre est déplacé vers la formation de fructose.

Hidden page

Hidden page

**V**

***QUALITÉ AU LABORATOIRE  
DE BIOCHIMIE***

## 13 - Qualité au laboratoire de biochimie

### Qualité d'un point de vue pratique ...

#### 1. Erreurs systématiques et aléatoires

##### 1.1. Erreurs systématiques

Affectent l'**exactitude** (ou **justesse**) de la mesure

Exactitude définie par deux paramètres :

\* **Degré d'inexactitude absolu** ou biais :  $x_o - \bar{x}$   
(où  $\bar{x}$  est la moyenne arithmétique de plusieurs mesures (minimum de 30 valeurs),  $x_o$  la valeur vraie (ou valeur attendue).

\* **Degré d'inexactitude relatif** ou biais relatif :

$$\frac{x_o - \bar{x}}{x_o} \text{ en pourcentage, } \frac{x_o - \bar{x}}{x_o} \cdot 100$$

Plus la valeur du degré d'inexactitude absolu est petite (ou plus la valeur du degré d'inexactitude relatif est petite), plus l'exactitude d'une mesure est grande.

##### 1.2. Erreurs aléatoires

Affectent la **précision** (ou **fidélité**) de la mesure

Précision définie par deux paramètres :

\* **Ecart type s**, ou racine carrée de la variance

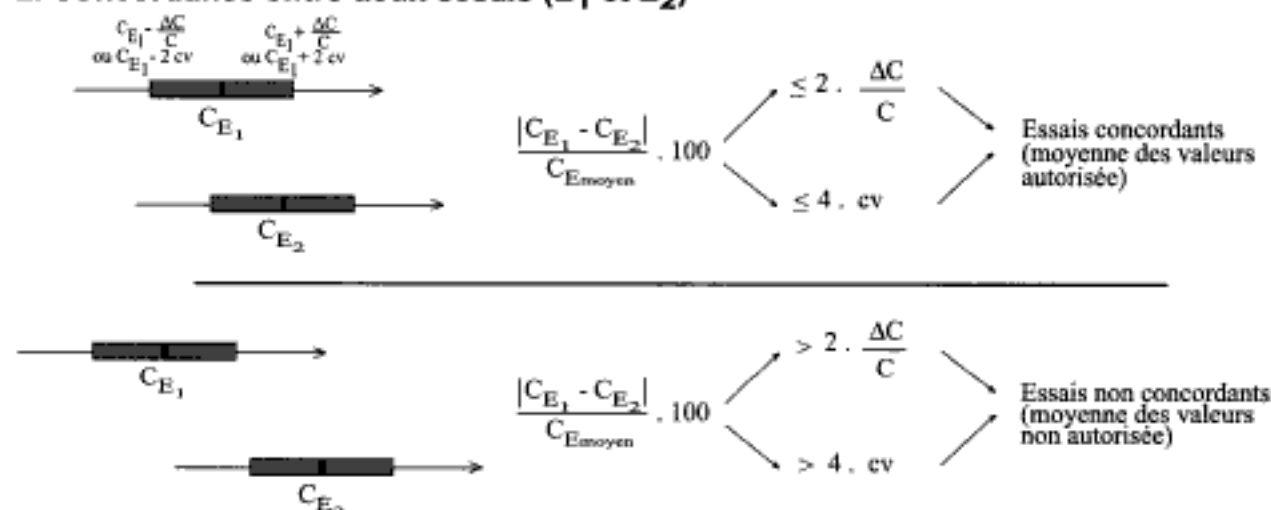
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

\* **Coefficient de variation** ou **cv** :

$$cv = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Plus la valeur de l'écart type est petite (ou plus la valeur du cv est petite), plus la précision d'une mesure est grande.

#### 2. Concordance entre deux essais ( $E_1$ et $E_2$ )



#### 3. Expression d'un résultat final - Chiffres significatifs

Soient :

- la concentration molaire moléculaire "C<sub>E</sub>" en soluté de l'essai E :  $C_E = 0,100000 \text{ mol.L}^{-1}$
- $\frac{\Delta C}{C} = 0,020 \%$
- $cv = 0,010 \%$

$$C_E \cdot \frac{\Delta C}{C} = 0,0020 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$C_E \cdot 2 \cdot cv = 0,0020 \text{ mol.L}^{-1}$$

$\left\{ \begin{array}{l} \text{La première décimale non nulle détermine le} \\ \text{nombre de chiffres significatifs, à savoir 3 ici.} \\ C_E = 0,100 \pm 0,002 \text{ mol.L}^{-1} \end{array} \right.$

## Qualité au laboratoire de biochimie : expression des résultats

La **qualité** correspond à l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites. L'**assurance qualité** regroupe l'ensemble des activités préétablies et systématiques mises en œuvre pour garantir qu'un produit ou un service satisfait à des exigences de qualité. La notion de qualité et la mise en place d'un système assurance qualité au niveau d'un laboratoire de biochimie doivent être assimilées à des notions techniques et organisationnelles. En effet, on pourrait définir la qualité au niveau du laboratoire de biochimie de la manière suivante : « **une organisation optimale permettant de fournir aux prescripteurs les résultats attendus, dans le respect des délais et de la traçabilité, avec la fiabilité requise** ».

### 1. Définitions

#### • Exactitude

L'**exactitude** (ou **justesse**) d'une méthode représente la qualité de l'accord entre l'estimation d'une quantité mesurable (valeur mesurée) et la valeur exacte (ou meilleure estimée de la valeur vraie, dans le cas d'obtention de la valeur par une technique de référence) ou la valeur attendue (dans le cas de l'utilisation d'une méthode donnée).

#### • Inexactitude

**Différence** numérique entre la **moyenne** d'une série de mesures répétées et la **valeur vraie**. Cette différence peut être positive ou négative. Elle peut être exprimée :

- avec l'unité utilisée pour la mesure de la quantité : on parle alors de **biais** ou d'**inexactitude absolue** ;
- ou en pourcentage de la valeur vraie : on parle alors de **biais relatif** ou d'**inexactitude relative**.

#### • Précision

La **précision** (ou **fidélité**) représente la qualité de l'accord, dans une zone définie de valeurs à mesurer, entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon, dans des conditions déterminées.

#### • Imprécision

C'est l'inverse de la précision estimée par l'**écart type** ou le **coefficient de variation** des résultats d'une série de mesures de répétabilité ou de reproductibilité (voir ci-dessous).

#### • Répétabilité

Expression quantitative de la précision lorsque le **même opérateur** applique la technique sur le même spécimen, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyse.

#### • Reproductibilité

Expression quantitative de la précision lorsque la technique est réalisée dans **diverses conditions** qui doivent être définies.

#### • Détectabilité (limite de détection)

Il s'agit du plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué, avec une probabilité donnée, d'un témoin de réaction.

#### • Sensibilité

C'est le quotient différentiel du signal mesuré sur la valeur à mesurer.

#### • Spécificité

Propriété que présente une méthode analytique de pouvoir déterminer l'analyte désiré, et seulement celui-ci, même si des substances de structure proche se trouvent en quantité importante dans l'échantillon à doser.

#### • Linéarité (limite de)

Limites de validité pour une probabilité donnée de la relation linéaire des valeurs théoriques aux valeurs observées.

#### • Degrés de liberté

C'est le nombre de **comparaisons indépendantes** susceptibles d'être effectuées sur  $n$  observations. On peut également le considérer comme le nombre de mesures effectuées dans la série moins le nombre de restrictions sur la série. Par exemple, il existe  $(n-1)$  degrés de liberté pour l'écart-type d'une série réalisée sur un échantillon de population (le risque pris dans l'échantillonnage correspond à une restriction sur la série).

#### • Risque $\alpha$ ou risque de première espèce

Probabilité de **rejeter une hypothèse vraie** à l'issue d'un test statistique. Ce risque est fixé avant de réaliser un test (habituellement 5 ou 1 %). On l'appelle aussi seuil ou niveau d'un test.

#### • Risque $\beta$ ou risque de deuxième espèce

Probabilité d'**accepter comme vraie une hypothèse fautive** à l'issue d'un test statistique. Le risque  $\beta$  dépend du test effectué, du risque  $\alpha$  choisi et du nombre de degrés de liberté.

Hidden page



### 3.2. Théorèmes de calcul

Lorsque les incertitudes ne sont pas liées les unes aux autres (cas des différentes opérations unitaires qui se succèdent dans un processus analytique en biochimie), on peut appliquer les deux théorèmes suivants :

- théorème de l'incertitude absolue sur les sommes et les différences

L'incertitude absolue sur une somme ou une différence est la somme des incertitudes absolues de chacun des termes.

$$X = X_1 + X_2 \longrightarrow \Delta X = \Delta X_1 + \Delta X_2$$

$$Y = Y_1 - Y_2 \longrightarrow \Delta Y = \Delta Y_1 + \Delta Y_2$$

- théorème de l'incertitude relative sur les produits et les quotients

L'incertitude relative sur un produit ou un quotient est la somme des incertitudes relatives de chacun des facteurs.

$$Z = Z_1 \cdot Z_2 \longrightarrow \frac{\Delta Z}{Z} = \frac{\Delta Z_1}{Z_1} + \frac{\Delta Z_2}{Z_2}$$

$$W = \frac{W_1}{W_2} \longrightarrow \frac{\Delta W}{W} = \frac{\Delta W_1}{W_1} + \frac{\Delta W_2}{W_2}$$

### 3.3. Exemples d'imprécision du matériel de laboratoire d'usage courant

#### 3.3.1. Imprécision sur la mesure des masses

L'imprécision absolue sur une pesée effectuée à la balance analytique :  $\Delta m = 0,1 \text{ mg} = 0,0001 \text{ g}$ .

Pour une pesée avec tarage automatique, il faut considérer 2 mesures, donc  $\Delta m = 0,2 \text{ mg} = 0,0002 \text{ g}$ .

#### 3.3.2. Imprécision sur les mesures de volumes

- **Burette de 25 mL** :  $\Delta V = 0,025 \text{ mL}$  (réglage du 0) +  $0,025 \text{ mL}$  (lecture de la chute de burette) + erreur de construction donnée par le fabriquant (généralement  $0,03 \text{ mL}$ ).

- **Pipettes jaugées de classe A**

| Volume en mL | $\Delta V$ en mL |
|--------------|------------------|
| 1            | 0,0070           |
| 2            | 0,010            |
| 5            | 0,015            |
| 10           | 0,020            |
| 20           | 0,030            |
| 25           | 0,030            |

- **Pipettes graduées de classe A**

| Volume en mL | Divisions | $\Delta V$ en mL |
|--------------|-----------|------------------|
| 1            | 1/100     | 0,0060           |
| 2            | 1/100     | 0,010            |
| 5            | 1/20      | 0,030            |
| 10           | 1/20      | 0,050            |
| 20           | 1/10      | 0,10             |
| 25           | 1/10      | 0,10             |

- **Pipettes automatiques**

|               | Volume en $\mu\text{L}$ | $\Delta V$ en $\mu\text{L}$ |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>P 100</b>  | 20                      | 0,35                        |
|               | 50                      | 0,40                        |
|               | 100                     | 0,80                        |
| <b>P 200</b>  | 50                      | 0,50                        |
|               | 100                     | 0,80                        |
|               | 200                     | 1,6                         |
| <b>P 1000</b> | 200                     | 3,0                         |
|               | 500                     | 4,0                         |
|               | 1000                    | 8,0                         |

- **Fioles jaugées de classe A**

| Volume en mL | $\Delta V$ en mL |
|--------------|------------------|
| 10           | 0,025            |
| 25           | 0,040            |
| 50           | 0,060            |
| 100          | 0,10             |
| 250          | 0,15             |
| 500          | 0,25             |

## 4. Evaluation statistique des erreurs aléatoires

### 4.1. La loi normale et variables statistiques

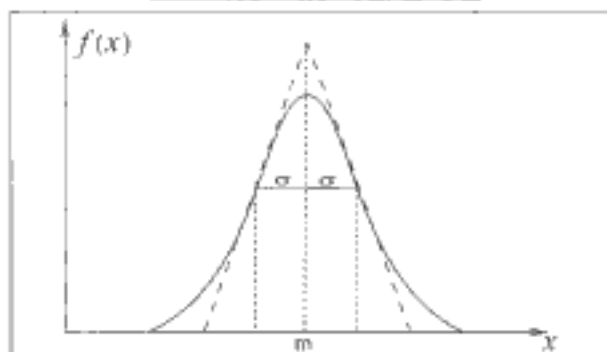
La loi normale ou loi de Laplace - Gauss,  $N(m, \sigma)$ , est une loi de distribution, applicable quand les causes de cette dispersion sont indépendantes les unes des autres.

Elle a pour expression :

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x-m}{\sigma} \right)^2} \quad \text{où : } - x_i = \text{valeur de la variable ;}$$

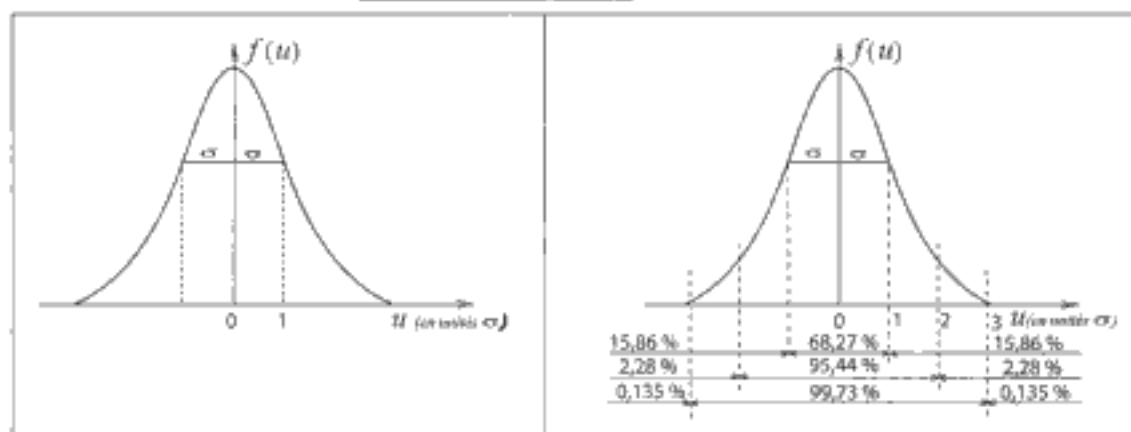
$$- m = \text{moyenne des valeurs de la variable ;}$$

$$- \sigma = \text{écart-type.}$$



La loi normale réduite ou loi normale gaussienne réduite,  $N(0,1)$ , a pour expression :

$$f(u) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} u^2} \quad \text{ou,} \quad u = \frac{x_i - m}{\sigma}$$



Une distribution normale des valeurs présente certaines caractéristiques :

- les écarts de faible amplitude se produisent fréquemment ;
- les écarts de forte amplitude se produisent rarement ;
- les écarts de même amplitude, mais de signe opposé, sont équiprobables : la courbe est symétrique par rapport à la médiane ou abscisse du maximum ;
- la valeur moyenne  $\bar{x}$  est confondue avec la médiane lorsque la détermination porte sur un grand nombre de points ;
- les points d'inflexion sont à  $\bar{x} + s$  et  $\bar{x} - s$ , de telle façon que :
  - 68,27 % des valeurs sont comprises dans la zone  $\bar{x} \pm s$  ;
  - 95,44 % des valeurs se trouvent dans la zone  $\bar{x} \pm 2 s$  ;
  - 99,73 % des valeurs se trouvent dans la zone  $\bar{x} \pm 3 s$ .

Ces lois permettent de définir des variables représentatives de la population :

- **Moyenne arithmétique** : somme des valeurs prises par la variable, divisée par l'effectif de la série.

On parle de  $m$  quand on analyse la totalité d'une population.  
de  $\bar{x}$  quand on analyse un échantillon de la population.

$$m = \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- **Ecart-type** : racine carrée de la variance.

On parle de  $\sigma_n$  pour la population totale.

de  $\sigma_{n-1}$  = s pour un échantillon de population.

- **Variance V** : somme des carrés des écarts à la moyenne des n observations divisée par le nombre de degrés de liberté.  
Le nombre de degrés de liberté est égal à n lorsqu'on étudie la population totale ; n-1 dans le cas de l'étude d'un échantillon.

$$\sigma_{n-1} = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\sigma_n = \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

- **Coefficient de variation** : c'est l'écart type exprimé en pourcentage de la moyenne. On parle d'écart type relatif.

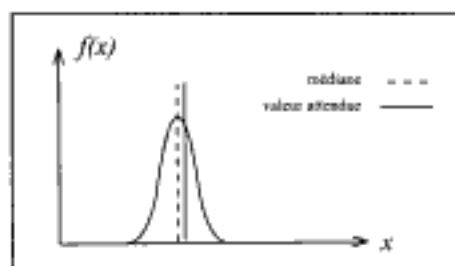
$$cv = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Le coefficient de variation correspond à une mesure spécifique de l'imprécision des analyses. Plus la valeur de l'écart type est petite (ou plus la valeur du cv est petite), plus la précision d'une mesure est grande.

L'expression des résultats doit toujours tenir compte de la précision de la méthode de dosage utilisée. A ce titre, il convient également d'arrondir le résultat final et lui seul.

Les études de dispersion des résultats et de comparaison de la valeur de la médiane par rapport à la valeur attendue rendent compte respectivement de la précision et de l'exactitude du dosage :

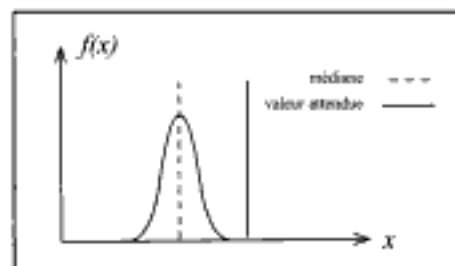
● **Cas n° 1 : médiane et valeur attendue confondues, dispersion faible**



Dosage **exact** car la médiane et la valeur attendue sont confondues : pas d'erreurs grossières.

Dosage **précis** car la dispersion est faible : les erreurs aléatoires sont réduites.

● **Cas n° 2 : médiane et valeur attendue différentes, dispersion faible**

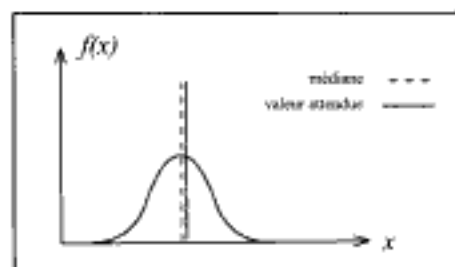


Dosage **inexact** car la médiane et la valeur attendue sont différentes.

Le dosage est cependant **précis**, car la dispersion est faible.

L'inexactitude est donc due à un **erreur systématique** qui a été répétée.

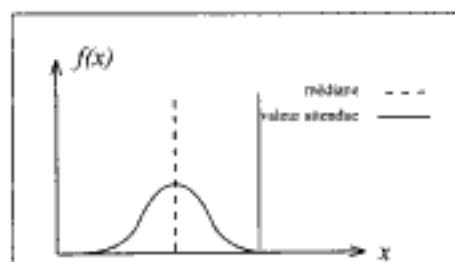
● **Cas n° 3 : médiane et valeur attendue confondues, dispersion forte**



Dosage **imprécis** car la dispersion est forte : les **erreurs aléatoires** sont importantes.

Dosage **exact** car la médiane et la valeur attendue sont confondues : pas d'erreurs grossières.

● **Cas n° 4 : médiane et valeur attendue différentes, dispersion forte**



Dosage **inexact et imprécis**. Il y a toutes les erreurs possibles : erreurs aléatoires importantes, doublées d'erreurs grossières.

En pratique, on cherche bien évidemment à se trouver dans le cas numéro 1. On cherche à éliminer toutes les erreurs grossières. On obtient un processus d'analyse stable dont on peut déterminer la dispersion normale :  $s$ . C'est l'équivalent statistique de ce que le fabricant indique sur les outils simples utilisés en volumétrie, et du calcul différentiel qu'on effectue pour calculer l'erreur maximale admissible sur un processus d'analyse. L'utilisation en est cependant légèrement différente.

## 4.2. Notion d'intervalle de confiance

En l'absence d'erreur systématique, la valeur exacte est égale à la moyenne des valeurs obtenues à partir d'un grand nombre de mesures. Comme il est matériellement impossible, en routine, de répéter un très grand nombre de fois la même mesure (pour des raisons de coût, de temps, de quantité d'échantillon disponible, ...), on se contente de réaliser la mesure une ou deux fois. La valeur obtenue lors d'une mesure ponctuelle correspond à une des valeurs  $x_i$  de la courbe de Gauss. Toutes les valeurs acceptables seront dispersées dans un intervalle  $[-\infty; +\infty]$  autour de la moyenne. Il est inconcevable de fonctionner avec cet intervalle, sachant que plus on s'éloigne de la valeur moyenne, plus la probabilité pour que la valeur soit juste diminue et inversement, plus la probabilité pour que cette valeur soit fautive augmente.

**Pratiquement, on travaillera avec un intervalle de confiance  $[-2s; +2s]$ .**

Il faut pour cela connaître la précision de la méthode.  $s$  aura été déterminé au préalable par une étude statistique des paramètres de la méthode utilisée. Cette étude correspond à ce qui s'appelle un protocole de validation de techniques d'analyses, dans lequel on détermine les qualités de la méthode, ses performances et ses limites.

Ceci veut dire que **l'on considérera que les valeurs sont justes si elles sont contenues dans cet intervalle.**

On considérera les valeurs sortant de cet intervalle comme fautes. On prend le risque de se tromper en procédant ainsi, risque calculable grâce à la loi normale :

- risque  $\alpha$  : on élimine 2,28 % de valeurs vraies de part et d'autre de l'intervalle retenu ; soit un risque  $\alpha$  d'environ 5 % ;
- risque  $\beta$  : on retient 95,44 % des valeurs ; certaines valeurs fautes se situent dans l'intervalle retenu et seront considérées comme vraies. Ce risque varie inversement au risque  $\alpha$ .

**Prendre un intervalle de confiance plus restreint : par exemple  $[-s; +s]$  revient à prendre un risque  $\alpha$  de 32 %, ce qui est énorme. En effet cela revient à considérer que l'on rejette 32 % de valeurs correctes : la manipulation devra être recommencée dans 1 cas sur 3 alors que le résultat était correct. Cependant, ceci réduit le risque  $\beta$  à quantité négligeable.**

**Prendre un intervalle de confiance plus large : par exemple  $[-3s; +3s]$  revient à prendre un risque  $\alpha$  de 0,3 % : le risque de rejeter une valeur vraie est donc très faible. Mais le risque  $\beta$ , d'accepter une valeur fautive, devient grand.**

**L'intervalle  $[-2s; +2s]$  semble être le meilleur compromis.**

## 4.3. Exploitation critique de ce calcul statistique

### 4.3.1. Deux essais sont-ils concordants ?

Comme on vient de le définir, ils doivent se trouver dans l'intervalle  $[-2s; +2s]$  autour de la valeur supposée vraie qui doit coïncider avec la moyenne, si la méthode est exacte. Ne connaissant pas la valeur vraie, on ne peut que comparer les deux valeurs entre elles.

Ces deux valeurs seront concordantes entre elles si l'écart qui les sépare ne dépasse pas **4 s**. Dans ce cas, on peut faire la moyenne qui sera considérée comme une bonne estimation de la valeur attendue. Si l'écart dépasse 4 s, cela veut très certainement dire qu'un des résultats au moins est entaché d'erreurs grossières et n'est donc pas fiable. On ne peut alors pas conclure au vu de ces résultats.

On peut également raisonner sur l'intervalle de confiance exprimé en valeur relative : l'écart relatif entre les deux valeurs ne doit pas être supérieur à 4 cv.

$$\frac{|x_1 - x_2|}{\frac{x_1 + x_2}{2}}, 100 \leq 4 \cdot cv$$

ou bien :

$$\frac{|x_1 - x_2|}{x_1 + x_2}, 100 \leq 2 \cdot cv$$

### 4.3.2. Expression du résultat final

Il faut exprimer le résultat final avec un nombre de chiffres significatifs en rapport avec l'imprécision de la manipulation. On calcule la valeur de 2 cv sur le résultat final et suivant que cette opération affecte le chiffre des unités, la première ou la deuxième décimale..., on rendra le résultat avec 0, 1 ou 2 décimales, ...

Exemple :

La calculatrice donne comme résultat du dosage du glucose dans un jus de fruit  $C = 5,4764 \dots \text{mmol.L}^{-1}$  ; le cv de la méthode utilisée est de 3 %.

On calcule  $C \cdot 2 \text{ cv} : 5,4764 \cdot 2 \cdot 3/100 = 0,33 \dots \text{mmol.L}^{-1}$ .

Le résultat sera donné avec **2 chiffres significatifs**, c'est-à-dire avec une décimale dans le système d'unité choisi : soit  $C = 5,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

### 4.3.3. Présentation du résultat final

Les incertitudes expérimentales doivent être arrondies avec un seul chiffre significatif. La règle énoncée présente une seule exception notable : si dans l'incertitude le chiffre dominant est « 1 », il est préférable de conserver deux chiffres significatifs. Dans l'exemple ci-dessus  $C \cdot 2 \text{ cv} = \pm 0,33 \text{ mmol.L}^{-1}$ , il conviendra de l'arrondir à  $C \cdot 2 \text{ cv} = \pm 0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Le résultat final sera présenté sous la forme :  $C = 5,5 \pm 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ .

## Énoncés des exercices

Tous les exercices de ce chapitre sont de niveau post-baccalauréat.

### **Exercice 1** Préparation d'une solution d'hydroxyde de sodium à environ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ Étalonnage de cette solution par pesées directes d'hydrogénophthalate de potassium

1. Préparation d'une solution d'hydroxyde de sodium (soude) à environ  $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$   
Calculer le volume de lessive de soude nécessaire pour préparer 2 litres de la solution d'hydroxyde de sodium désirée.  
Pour la lessive de soude, il est indiqué sur le flacon commercial :

- $M_{\text{NaOH}} = 40 \text{ g.mol}^{-1}$  ;
- $d = 1,33 - 1,35$  ;
- pureté 30 % à 32 % minimum.

2. Etalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium préparée par pesées directes d'hydrogénophthalate de potassium  
L'étalonnage est réalisé selon le protocole ci-dessous (réaliser deux essais).

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, introduire :

- masse pesée d'hydrogénophthalate de potassium..... m g ;
- dissoudre dans de l'eau distillée ;
- indicateur coloré, phénol-phtaléine..... 2 gouttes.

Doser par la solution d'hydroxyde de sodium à étalonner jusqu'au virage de l'indicateur.

- 2.1. Présenter les équations du dosage.
- 2.2. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la masse m d'hydrogénophthalate de potassium à peser pour l'étalonnage.
- 2.3. Sachant que l'on désire une chute de burette d'hydroxyde de sodium voisine de 10 mL, calculer cette masse.
- 2.4. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium préparée.
- 2.5. Calculer cette concentration molaire pour chacun des essais à l'aide des résultats expérimentaux suivants :

| Hydrogénophthalate de potassium<br>en g | Hydroxyde de sodium<br>en mL |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| 0,3083                                  | 9,90                         |
| 0,3268                                  | 10,45                        |

2.6. Conclure sur la concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium préparée après avoir déterminé l'imprécision des mesures faites (intégrer les notions de concordance des essais et de chiffres significatifs à la conclusion).

### **Exercice 2** Détermination de l'alcalinité d'une eau de consommation par volumétrie

On évalue l'alcalinité d'une eau de consommation par dosage acidimétrique des ions carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  et des ions hydrogencarbonate  $\text{HCO}_3^-$  qui s'y trouvent présents. Ce dosage est fait en utilisant successivement deux indicateurs colorés :

- la phénol-phthaléine pour doser les ions carbonate ;
- l'hélianthine pour doser ensuite les ions hydrogencarbonate.

1. Etalonnage de la solution d'acide chlorhydrique à environ  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ , par pesées indirectes de carbonate de sodium anhydre ( $M = 106 \text{ g.mol}^{-1}$ )

L'étalonnage est réalisé selon le protocole ci-dessous (réaliser deux essais).

- Préparer 100 mL d'une solution de carbonate de sodium par pesée de m g de carbonate de sodium anhydre, de manière à pouvoir étalonner la solution d'acide chlorhydrique selon le protocole ci-dessous.

(On considère que le volume de chute de burette prévisionnel sera d'environ 15 mL).

- Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, introduire :

- solution étalon de carbonate de sodium..... 10 mL ;
- eau distillée..... 20 mL ;
- indicateur coloré, hélianthine..... 2 gouttes.

Doser par la solution d'acide chlorhydrique à étalonner jusqu'au virage de l'indicateur.

- 1.1. Présenter les équations du dosage.

- 1.2. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la masse  $m$  de carbonate de sodium anhydre à peser pour préparer la solution étalon de carbonate de sodium. Calculer la masse de carbonate de sodium anhydre nécessaire.
- 1.3. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique préparée. Calculer cette concentration molaire pour chacun des essais à l'aide des résultats expérimentaux suivants :

| Carbonate de sodium<br>en g | Acide chlorhydrique<br>$V_1$ en mL |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 0,1602                      | 15,00                              |
| 0,1693                      | 15,90                              |

- 1.4. Conclure sur la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique après avoir déterminé l'imprécision des mesures faites (intégrer les notions de concordance des essais et de chiffres significatifs à la conclusion).

## 2. Détermination de l'alcalinité d'une eau de consommation

La détermination de l'alcalinité d'une eau est réalisée selon le protocole ci-dessous (réaliser deux essais).

- Détermination de l'alcalinité à la phénol-phtaléine.

Dans une fiole d'Erlenmeyer, introduire :

- eau à analyser..... 25 mL ;
- indicateur, phénol-phtaléine..... 2 gouttes.

Si la solution est rose, verser la solution d'acide chlorhydrique jusqu'à décoloration. Soit  $V_1$  mL le volume d'acide versé.

Si la solution est incolore, l'eau est dépourvue d'ions carbonate et  $V_1 = 0,00$  mL.

- Détermination de l'alcalinité à l'hélianthine.

Dans la fiole d'Erlenmeyer précédente, rajouter 4 gouttes d'hélianthine et verser la solution d'acide jusqu'au virage de l'indicateur à l'orange.

Soit  $V_2$  mL le volume versé.

2.1. Présenter les équations des dosages.

2.2. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la concentration molaire en ions carbonate de l'eau de consommation.

2.3. Etablir la formule littérale nécessaire au calcul de la concentration molaire en ions hydrogencarbonate de l'eau de consommation.

2.4. Calculer ces concentrations molaires pour chacun des essais à l'aide des résultats expérimentaux suivants :

| Eau de consommation<br>$V_{EAU}$ en mL | HCl<br>$V_2$ en mL | HCl<br>$V_3$ en mL |
|----------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 25,00                                  | 0,20               | 8,95               |
| 25,00                                  | 0,20               | 8,90               |

- 2.5. Conclure sur les concentrations molaires en ions carbonate et en ions hydrogencarbonate de l'eau de consommation après avoir déterminé l'imprécision des mesures faites (intégrer les notions de concordance des essais et de chiffres significatifs à la conclusion).

## Exercice 3 Détermination de la précision et de l'exactitude d'une méthode de dosage des nitrites

Mode opératoire

- Gamme d'étalonnage

A partir d'une solution étalon de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à  $3,60 \text{ mg.L}^{-1}$ , préparer une gamme d'étalonnage selon les indications du tableau ci-dessous :

| Tubes                         | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Solution étalon (mL)          | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
| Eau distillée (mL)            | 5   | 4   | 3   | 2   | 1   | 0   |
| Réactif (de diazotation) (mL) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

Mélanger. Laisser la coloration se développer 10 min environ. Lire l'absorbance à 537 nm.

- Dosage des ions nitrite d'une solution contrôle (30 essais " $C_n$ ")

- peser environ précisément une masse de nitrite de sodium de  $0,036 \text{ g}$  ;
- dissoudre dans une fiole jaugée de  $200 \text{ mL}$  ;
- diluer la solution obtenue au  $1/100$ . Cette nouvelle solution constitue la solution contrôle ;
- réaliser 30 essais " $C_n$ " sur  $5 \text{ mL}$  de la solution contrôle ;
- lire l'absorbance à  $537 \text{ nm}$  contre le tube témoin réactif et la gamme étalon traitée de la même manière.

1. Calculer la quantité d'ions nitrite présents dans chaque tube de la gamme étalon. Exprimer ce résultat en  $\mu\text{g}$  par tube.

2. Tracer la courbe d'étalonnage ( $\text{Absorbance} = f(\mu\text{g d'ions nitrite par tube})$ ), donner l'équation de la droite de régression ainsi que le coefficient de corrélation.

3. Calculer les concentrations expérimentales en ions nitrite de la solution contrôle, soit " $C_n$ " ces concentrations.

Hidden page

**Données :**

- Résultats expérimentaux :

- Pour la solution contrôle, masse de glucose pesée :  $m = 0,1006 \text{ g}$ 

- Absorbances lues à 530 nm :

| Tubes       | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | $E_1$ | $E_2$ | $C_1$ | $C_2$ |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbances | 0,000 | 0,201 | 0,419 | 0,635 | 0,849 | 1,069 | 0,280 | 0,285 | 0,590 | 0,588 |

- cv de la méthode = 3 %

-  $M_{\text{glucose}} = 180,16 \text{ g.mol}^{-1}$ **Exercice 5**      **Contrôle gravimétrique rapide d'une pipette automatique**

La manipulation précédente fait appel à l'utilisation d'une pipette automatique de 1000  $\mu\text{L}$  à volume variable. Ces pipettes automatiques doivent être contrôlées régulièrement et selon des protocoles définis par le constructeur ou par une norme. Il s'agit, pour cette manipulation, d'effectuer un contrôle rapide d'une pipette automatique de 1000  $\mu\text{L}$  à volume variable selon les indications du fabricant. Ce contrôle doit être enregistré sur une carte de contrôle afin de visualiser, détecter et signaler un éventuel dysfonctionnement.

**Mode opératoire**

- choisir un récipient de pesée dont la capacité est de 10 à 15 fois le volume du test ;
- placer une petite quantité d'eau dans le récipient de pesée ;
- afficher 500  $\mu\text{L}$  sur la pipette à tester ;
- positionner le cône ;
- effectuer deux pré-rinçages ;
- noter la température de l'eau ;
- placer le récipient de pesée sur le plateau de la balance, fermer la porte ;
- faire le zéro ;
- pipeter l'eau ;
- ouvrir la porte de la balance, déposer l'échantillon, fermer la porte ;
- attendre la stabilisation de l'affichage (si l'affichage n'est pas stable, noter la valeur au bout d'un temps défini : 15, 20 ou 30 secondes et dans ce cas conserver ce temps pour toutes les mesures) ;
- répéter la présente détermination quatre fois.

**Questions**

1. Utiliser le tableau en *annexe 1* (page, suivante) pour calculer le volume et l'étendue.
2. Compléter la carte aux moyennes et aux étendues *annexe 2* (pages suivantes), conclure et indiquer sur le compte-rendu la décision adaptée.

**Données :**

- Résultats expérimentaux :

| Essai  | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| m en g | 0,5020 | 0,5030 | 0,5038 | 0,5023 | 0,5018 |

- Pression atmosphérique : 1013 hPa.

- Température de l'eau : 21,5 °C.



## Annexe I

Valeur du facteur de correction  $Z$  ( $\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) pour l'eau distillée, en fonction de la température de l'eau et de la pression atmosphérique.

| Température<br>en °C | Pression d'air<br>en hPa (mbar) |        |        |        |        |        |
|----------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                      | 800                             | 853    | 907    | 960    | 1013   | 1067   |
| 15,0                 | 1,0018                          | 1,0018 | 1,0019 | 1,0019 | 1,0020 | 1,0020 |
| 15,5                 | 1,0018                          | 1,0019 | 1,0019 | 1,0020 | 1,0020 | 1,0021 |
| 16,0                 | 1,0019                          | 1,0020 | 1,0020 | 1,0021 | 1,0021 | 1,0022 |
| 16,5                 | 1,0020                          | 1,0020 | 1,0021 | 1,0022 | 1,0022 | 1,0023 |
| 17,0                 | 1,0021                          | 1,0021 | 1,0022 | 1,0022 | 1,0023 | 1,0023 |
| 17,5                 | 1,0022                          | 1,0022 | 1,0023 | 1,0023 | 1,0024 | 1,0024 |
| 18,0                 | 1,0022                          | 1,0023 | 1,0024 | 1,0024 | 1,0025 | 1,0025 |
| 18,5                 | 1,0023                          | 1,0024 | 1,0025 | 1,0025 | 1,0026 | 1,0026 |
| 19,0                 | 1,0024                          | 1,0025 | 1,0025 | 1,0026 | 1,0027 | 1,0027 |
| 19,5                 | 1,0025                          | 1,0026 | 1,0026 | 1,0027 | 1,0028 | 1,0028 |
| 20,0                 | 1,0026                          | 1,0027 | 1,0027 | 1,0028 | 1,0029 | 1,0029 |
| 20,5                 | 1,0027                          | 1,0028 | 1,0028 | 1,0029 | 1,0030 | 1,0030 |
| 21,0                 | 1,0028                          | 1,0029 | 1,0030 | 1,0030 | 1,0031 | 1,0031 |
| 21,5                 | 1,0030                          | 1,0030 | 1,0031 | 1,0031 | 1,0032 | 1,0032 |
| 22,0                 | 1,0031                          | 1,0031 | 1,0032 | 1,0032 | 1,0033 | 1,0033 |
| 22,5                 | 1,0032                          | 1,0032 | 1,0033 | 1,0033 | 1,0034 | 1,0035 |
| 23,0                 | 1,0033                          | 1,0033 | 1,0034 | 1,0035 | 1,0035 | 1,0036 |
| 23,5                 | 1,0034                          | 1,0035 | 1,0035 | 1,0036 | 1,0036 | 1,0037 |
| 24,0                 | 1,0035                          | 1,0036 | 1,0036 | 1,0037 | 1,0038 | 1,0038 |
| 24,5                 | 1,0037                          | 1,0037 | 1,0038 | 1,0038 | 1,0039 | 1,0039 |
| 25,0                 | 1,0038                          | 1,0038 | 1,0039 | 1,0039 | 1,0040 | 1,0041 |
| 25,5                 | 1,0039                          | 1,0040 | 1,0040 | 1,0041 | 1,0041 | 1,0042 |
| 26,0                 | 1,0040                          | 1,0041 | 1,0042 | 1,0042 | 1,0043 | 1,0043 |
| 26,5                 | 1,0042                          | 1,0042 | 1,0043 | 1,0043 | 1,0044 | 1,0045 |
| 27,0                 | 1,0043                          | 1,0044 | 1,0044 | 1,0045 | 1,0045 | 1,0046 |
| 27,5                 | 1,0044                          | 1,0045 | 1,0046 | 1,0046 | 1,0047 | 1,0047 |
| 28,0                 | 1,0046                          | 1,0046 | 1,0047 | 1,0048 | 1,0048 | 1,0049 |
| 28,5                 | 1,0047                          | 1,0048 | 1,0048 | 1,0049 | 1,0050 | 1,0050 |
| 29,0                 | 1,0049                          | 1,0049 | 1,0050 | 1,0050 | 1,0051 | 1,0052 |
| 29,5                 | 1,0050                          | 1,0051 | 1,0051 | 1,0052 | 1,0052 | 1,0053 |
| 30,0                 | 1,0052                          | 1,0051 | 1,0053 | 1,0053 | 1,0054 | 1,0055 |

Hidden page

**Exercice 6**      **Choix d'une méthode de dosage des phosphates**

Le choix d'une méthode est fondé sur ses qualités analytiques : spécificité, sensibilité et limite de détection mais aussi d'autres critères : facilité de mise en œuvre, rapidité, coût des réactifs et du matériel nécessaire, ...

Nous nous proposons de choisir une méthode de dosage des phosphates en fonction de la sensibilité de la méthode.

Détermination de la sensibilité d'une méthode de dosage des phosphates (méthode A)

- A partir de la solution mère de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à  $0,6805 \text{ g.L}^{-1}$ , préparer 50 mL d'une solution étalon fille à 0,5 mmol de phosphore par litre.
- Utiliser la solution étalon confectionnée pour préparer une gamme d'étalonnage contenant de 0 à 1  $\mu\text{mol}$  de P par tube (6 points sont obligatoires, chaque point de la gamme d'étalonnage doit être réalisé en double).
- Dans des cuves spectrophotométriques, introduire :
  - X mL de la solution étalon de P ;
  - (2 - X) mL d'eau distillée ;
  - 0,8 mL de réactif sulfomolybdique ;
  - 0,4 mL de solution d'hydroquinone ;
  - 0,4 mL de solution de sulfite de sodium ;
  - Homogénéiser ;
  - Laisser reposer 20 minutes à l'obscurité ;
  - Lire les absorbances à 700 nm.

**Questions**

1. Définir les termes : spécificité, sensibilité et limite de détection.
2. Présenter les calculs permettant de préparer la solution étalon utilisée pour confectionner la gamme d'étalonnage.
3. Donner un tableau de travail complet pour la gamme d'étalonnage.
4. Tracer la courbe d'étalonnage en faisant apparaître les 2 points pour chaque étalon.
5. Donner l'équation de la droite de régression et calculer le coefficient de corrélation.
6. Déterminer la sensibilité de la méthode exprimée en  $\mu\text{mol}^{-1}$  (\*).
7. Pour chaque étalon, discuter de la répétabilité, sachant que la différence entre deux essais réalisés par le même opérateur avec les mêmes réactifs et le même appareillage dans une même série de mesure ne doit pas excéder 5 %.
8. Une méthode B de dosage des phosphates a une sensibilité de  $0,050 \mu\text{mol}^{-1}$ . En fonction de cette indication et des résultats obtenus avec la méthode A, choisir la méthode la plus sensible pour les dosages des phosphates.

**Données :**

- Résultats expérimentaux :

| Tubes       | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbances | 0,000 | 0,240 | 0,480 | 0,728 | 0,963 | 1,226 |
|             | 0,000 | 0,245 | 0,476 | 0,730 | 0,967 | 1,217 |

-  $M_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 136,1 \text{ g.mol}^{-1}$  ;

-  $M_{\text{P}} = 30,97 \text{ g.mol}^{-1}$ .

(\*) Les volumes totaux des milieux de lecture sont identiques pour les méthodes A et B.

**Remarque :**

Dans l'hypothèse de la comparaison de deux méthodes où les volumes totaux des milieux de lecture ne sont pas identiques, il faudrait exprimer les sensibilités en concentration (ex : si la concentration de l'analyte mesuré est exprimée en  $\mu\text{mol}$  par mL de milieu de lecture, la sensibilité sera exprimée en  $\text{mL}.\mu\text{mol}^{-1}$ ).

Hidden page

- ✓ Calcul du pourcentage d'écart « E » entre les deux valeurs expérimentales  $E = \left| \frac{0,152490 - 0,153133}{\frac{0,152490 + 0,153133}{2}} \right| \cdot 100 = 0,42 \%$

Le pourcentage d'écart entre les deux valeurs expérimentales est inférieur à deux fois la valeur de  $\Delta C / C$ , les résultats sont concordants, la moyenne des deux valeurs expérimentales peut être calculée.

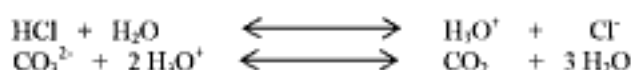
$$\bar{C} = \frac{C_2 + C_2'}{2}, \text{ soit } \bar{C} = \frac{0,152490 + 0,153133}{2} = 0,152812 \text{ mol.L}^{-1}$$

- ✓ Incertitude absolue  $\Delta C = \frac{\Delta C}{C} \cdot \bar{C}$  soit  $\Delta C = \frac{0,9}{100} \cdot 0,152812 = 0,00137531 \text{ mol.L}^{-1}$
- ✓ Expression finale du résultat  
La concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium préparée est de  $0,153 \pm 0,0014 \text{ mol.L}^{-1}$ .

## Exercice 2 Détermination de l'alcalinité d'une eau de consommation par volumétrie

1. Etalonnage de la solution d'acide chlorhydrique à environ  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ , par pesées indirectes de carbonate de sodium anhydre

1.1. Equations de dosage



1.2. Masse de carbonate de sodium anhydre à peser

A l'équivalence le nombre de moles « n<sub>1</sub> » d'ions hydronium cédés par l'acide (acide chlorhydrique) est égal au nombre de moles « n » d'ions hydronium acceptés par la base (carbonate de sodium).

$$\Leftrightarrow n_1 = n$$

$$\Leftrightarrow C_1 \cdot V_1 \cdot 1 = C \cdot V \cdot 2$$

$$\text{or } C = \frac{m}{V_{SP} \cdot M}$$

avec : m : masse de carbonate de sodium pesée  
V<sub>SP</sub> : volume de solution de carbonate de sodium préparée  
M : masse molaire moléculaire du carbonate de sodium

$$\Leftrightarrow m = \frac{C_1 \cdot V_1 \cdot V_{SP} \cdot M}{V \cdot 2} \quad \text{soit} \quad m = \frac{0,02 \cdot 15 \cdot 10^{-3} \cdot 100 \cdot 10^{-3} \cdot 106}{10 \cdot 10^{-3} \cdot 2} = 0,1590 \text{ g}$$

1.3. Calcul de la concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique

$$\text{Selon le même raisonnement, on obtient : } C_1 = \frac{m \cdot V \cdot 2}{M \cdot V_{SP} \cdot V_1}$$

Les applications numériques donnent les résultats suivants :

$$C_1 = \frac{0,1602 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \cdot 2}{106 \cdot 100 \cdot 10^{-3} \cdot 15,00 \cdot 10^{-3}} = 0,0201509 \text{ mol.L}^{-1} \quad C_1' = \frac{0,1693 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \cdot 2}{106 \cdot 100 \cdot 10^{-3} \cdot 15,90 \cdot 10^{-3}} = 0,0200902 \text{ mol.L}^{-1}$$

1.4. Conclusion

- ✓ Incertitude relative du dosage  $\frac{\Delta C}{C} = \frac{\Delta m}{m} + \frac{\Delta V}{V} + \frac{\Delta V_{SP}}{V_{SP}} + \frac{\Delta V_1}{V_1}$   
soit  $\frac{\Delta C}{C} = \frac{0,0002}{0,159} + \frac{0,02}{10} + \frac{0,1}{100} + \frac{0,08}{15} = 9,59 \cdot 10^{-3}$  soit 1%

- ✓ Calcul du pourcentage d'écart « E » entre les deux valeurs expérimentales

$$E = \left| \frac{0,0201509 - 0,0200902}{\frac{0,0201509 + 0,0200902}{2}} \right| \cdot 100 = 0,30 \%$$

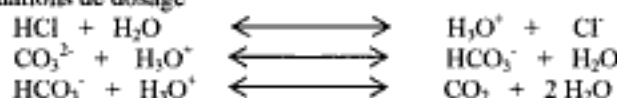
Le pourcentage d'écart entre les deux valeurs expérimentales est inférieur à deux fois la valeur de  $\Delta C / C$ , les résultats sont concordants, la moyenne des deux valeurs expérimentales peut être calculée.

$$\bar{C}_1 = \frac{C_1 + C_1'}{2}, \text{ soit } \bar{C}_1 = \frac{0,0201509 + 0,0200902}{2} = 0,0201206 \text{ mol.L}^{-1}$$

- ✓ Incertitude absolue  $\Delta C = \frac{\Delta C}{C} \cdot \bar{C}_1$  soit  $\Delta C = \frac{1}{100} \cdot 0,0201206 = 0,000201206 \text{ mol.L}^{-1}$
- ✓ Expression finale du résultat  
La concentration molaire de la solution d'acide chlorhydrique est de  $0,0201 \pm 0,0002 \text{ mol.L}^{-1}$ .

## 2. Détermination de l'alcalinité d'une eau de consommation

## 2.1. Equations de dosage



## 2.2. Calcul de la concentration molaire en ions carbonate de l'eau de consommation

A l'équivalence et en présence de phénol-phtaléine, le nombre de moles d'ions hydronium cédés par l'acide (acide chlorhydrique) est égal au nombre de moles d'ions hydronium acceptés par la base (carbonate de sodium).

$$\begin{aligned} n_1 &= n_2 \\ \Leftrightarrow C_1 \cdot V_2 \cdot 1 &= C_C \cdot V_{\text{EAU}} \cdot 1 \\ \Leftrightarrow C_C &= C_1 \cdot V_2 / V_{\text{EAU}} \end{aligned}$$

## 2.3. Calcul de la concentration molaire en ions hydrogencarbonate de l'eau de consommation

A l'équivalence et en présence d'hélianthine, le nombre de moles d'ions hydronium cédés par l'acide (acide chlorhydrique) est égal au nombre de moles d'ions hydronium acceptés par la base (hydrogencarbonate de sodium présent dans l'eau et hydrogencarbonate de sodium issu de la transformation des ions carbonate en ions hydrogencarbonate lors de la première partie du dosage).

$$\begin{aligned} n_1 &= n_{\text{HC}} + n_{\text{HC}'} \\ \Leftrightarrow C_1 \cdot (V_3 - V_2) \cdot 1 &= C_{\text{HC}} \cdot V_{\text{EAU}} \cdot 1 + C_C \cdot V_{\text{EAU}} \cdot 1 \\ \text{or } C_C &= C_1 \cdot V_2 / V_{\text{EAU}} \\ \Leftrightarrow C_{\text{HC}} &= C_1 \cdot (V_3 - 2 \cdot V_2) / V_{\text{EAU}} \end{aligned}$$

## 2.4. Calcul des concentrations molaires pour chacun des essais

- Pour les ions carbonate, les applications numériques donnent les résultats suivants :

$$C_C = \frac{0,0201 \cdot 0,20 \cdot 10^{-3}}{25,00 \cdot 10^{-3}} = 0,000160800 \text{ mol.L}^{-1} \quad C_C' = \frac{0,0201 \cdot 0,20 \cdot 10^{-3}}{25,00 \cdot 10^{-3}} = 0,000160800 \text{ mol.L}^{-1}$$

- Pour les ions hydrogencarbonate, les applications numériques donnent les résultats suivants :

$$C_{\text{HC}} = \frac{0,0201 \cdot (8,95 - 2 \cdot 0,20) \cdot 10^{-3}}{25,00 \cdot 10^{-3}} = 0,00687420 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$C_{\text{HC}'} = \frac{0,0201 \cdot (8,90 - 2 \cdot 0,20) \cdot 10^{-3}}{25,00 \cdot 10^{-3}} = 0,00683400 \text{ mol.L}^{-1}$$

## 2.5. Conclusions

- Pour les ions carbonate :

✓ Les résultats expérimentaux sont identiques, donc concordants. Le calcul de l'incertitude est cependant nécessaire pour l'estimation de la précision du résultat.

$$\begin{aligned} \text{✓ Incertitude relative du dosage} \quad \frac{\Delta C}{C} &= \frac{\Delta C_1}{C_1} + \frac{\Delta V_2}{V_2} + \frac{\Delta V_{\text{EAU}}}{V_{\text{EAU}}} \\ \text{soit } \frac{\Delta C}{C} &= \frac{1}{100} + \frac{0,08}{0,2} + \frac{0,03}{25} = 0,4112 \text{ soit } 41\% \end{aligned}$$

$$\text{✓ Incertitude absolue} \quad \Delta C = \frac{\Delta C}{C} \cdot C_C \text{ soit } \Delta C = \frac{41}{100} \cdot 0,000160800 = 0,000065928 \text{ mol.L}^{-1}$$

✓ Expression finale du résultat

La concentration molaire en ions carbonate de l'eau de consommation est de  $0,00016 \pm 0,00007 \text{ mol.L}^{-1}$ .

- Pour les ions hydrogencarbonate :

$$\begin{aligned} \text{✓ Incertitude relative du dosage} \quad \frac{\Delta C}{C} &= \frac{\Delta C_1}{C_1} + \frac{\Delta(V_3 - 2 \cdot V_2)}{V_3 - 2 \cdot V_2} + \frac{\Delta V_{\text{EAU}}}{V_{\text{EAU}}} \\ \frac{\Delta C}{C} &= \frac{\Delta C_1}{C_1} + \frac{\Delta V_3 + 2 \cdot \Delta V_2}{V_3 - 2 \cdot V_2} + \frac{\Delta V_{\text{EAU}}}{V_{\text{EAU}}} \\ \text{soit } \frac{\Delta C}{C} &= \frac{1}{100} + \frac{0,08 + 2 \cdot 0,08}{9 - 2 \cdot 0,2} + \frac{0,03}{25} = 3,91 \cdot 10^{-3} \text{ soit } 4\% \end{aligned}$$

L'incertitude calculée ci-dessus est nécessaire pour l'estimation de la précision du résultat. Cependant, il convient de calculer un terme « réduit » pour estimer la concordance entre les résultats expérimentaux car la concentration de l'acide chlorhydrique utilisé pour le dosage n'influe pas sur cette concordance.

$$\frac{\Delta C'}{C'} = \frac{\Delta(V_3 - 2 \cdot V_2)}{V_3 - 2 \cdot V_2} + \frac{\Delta V_{\text{EAU}}}{V_{\text{EAU}}} = \frac{\Delta C'}{C'} = \frac{\Delta V_3 + 2 \cdot \Delta V_2}{V_3 - 2 \cdot V_2} + \frac{\Delta V_{\text{EAU}}}{V_{\text{EAU}}}$$

$$\text{soit } \frac{\Delta C'}{C'} = \frac{0,08 + 2 \cdot 0,08}{9 - 2 \cdot 0,2} + \frac{0,03}{25} = 2,91 \cdot 10^{-3} \text{ soit } 3\%$$

Hidden page

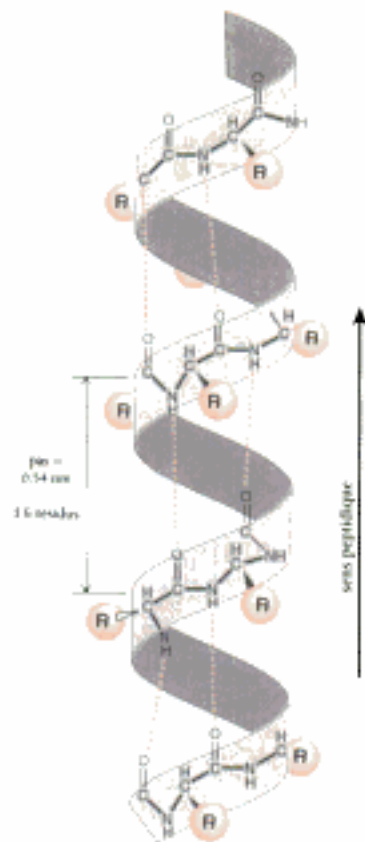
Hidden page



Hidden page

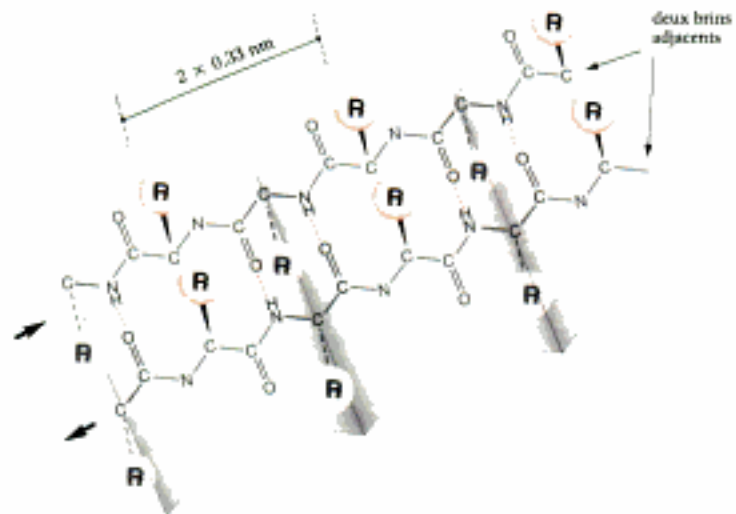
Hidden page

### Hélice

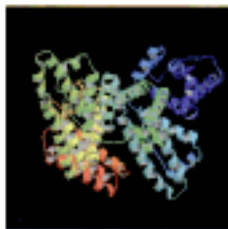
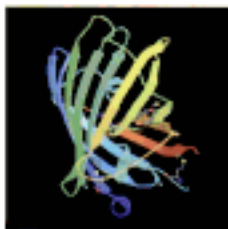

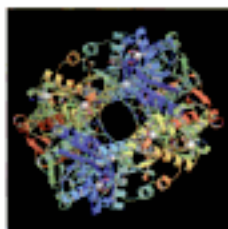


Source : Durliat, Biochimie structurale, (1997), Diderot Éditeurs, Paris, p. 192.  
 Reproduit avec l'aimable autorisation de l'éditeur.

### Feuillets plissés (antiparallèles)



Source : Durliat, Biochimie structurale, (1997), Diderot Éditeurs, Paris, p. 192.  
 Reproduit avec l'aimable autorisation de l'éditeur.

| Protéines à domaine $\alpha$                                                        | Protéines à domaine $\beta$                                                         | Protéines à domaine $\alpha/\beta$                                                   | Protéines à domaine $\alpha+\beta$                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| uniquement constituées d'hélices $\alpha$                                           | noyau constitué de 4 à 10 feuillets $\beta$ antiparallèles : centre hydrophobe      | feuillets $\beta$ (centraux) entourés d'hélices $\alpha$                             | hélices et feuillets plissés fortement imbriqués dans la même molécule                |
| sérumalbumine<br>code pdb: 1AO6<br>voir « Bioinformatique »                         | inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase<br>code pdb: 1HOE<br>voir « Bioinformatique »    | phosphofruktokinase<br>code pdb: 1PFK<br>voir « Bioinformatique »                    | green fluorescent protein<br>code pdb: 1EMA<br>voir « Bioinformatique »               |
|  |  |  |  |

## Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique

La prise en compte des évolutions de la biochimie a présidé à l'élaboration de cette troisième édition. Ainsi, les techniques d'analyse et de dosage des biomolécules connaissent des progrès significatifs : les méthodes optiques deviennent des outils essentiels du biochimiste, les techniques comme la chromatographie et l'électrophorèse s'améliorent constamment et l'utilisation de « kits » pour les dosages et les extractions/purifications est désormais courante.

Ces techniques permettent une étude de plus en plus fine des biomolécules et en particulier des macromolécules informatives telles que les acides nucléiques et les protéines. La biochimie se doit, dès lors, pour l'étude des phénomènes biologiques, d'intégrer l'aspect « biologie moléculaire » et les techniques du génie génétique. Dans ce domaine, l'accumulation des connaissances est telle que le développement de nouveaux outils informatiques est indispensable. Avec eux, une discipline nouvelle émerge : la bioinformatique.

Cette évolution se concrétise aussi par la fourniture d'un supplément à l'ouvrage sous forme de cédérom. Celui-ci propose une extension des possibilités d'exercices : quiz d'enzymologie sous forme d'animations Flash, reprise de certains exercices de biologie moléculaire et de la totalité de ceux de bioinformatique avec la possibilité de les faire en ligne. Un important annuaire de liens Internet classés par thèmes est également mis à disposition du lecteur.

Cet ouvrage s'adresse :

- aux élèves et professeurs des classes de première et terminale série « Sciences et techniques de laboratoire », spécialité « Biochimie - Génie biologique »,
- aux étudiants et professeurs des classes de BTS « Analyses biologiques », « Biotechnologies », « Bioanalyses et contrôles », « Qualité dans les industries alimentaires et les bioindustries » et « Métiers de l'eau »,
- aux étudiants et professeurs des différents DUT Génie biologique et DEUG Sciences de la vie, ainsi qu'à ceux des CPGE « Technologie et biologie ».

ISBN : 2-7040-1215-6



9 782704 101215  
Copyrighted material