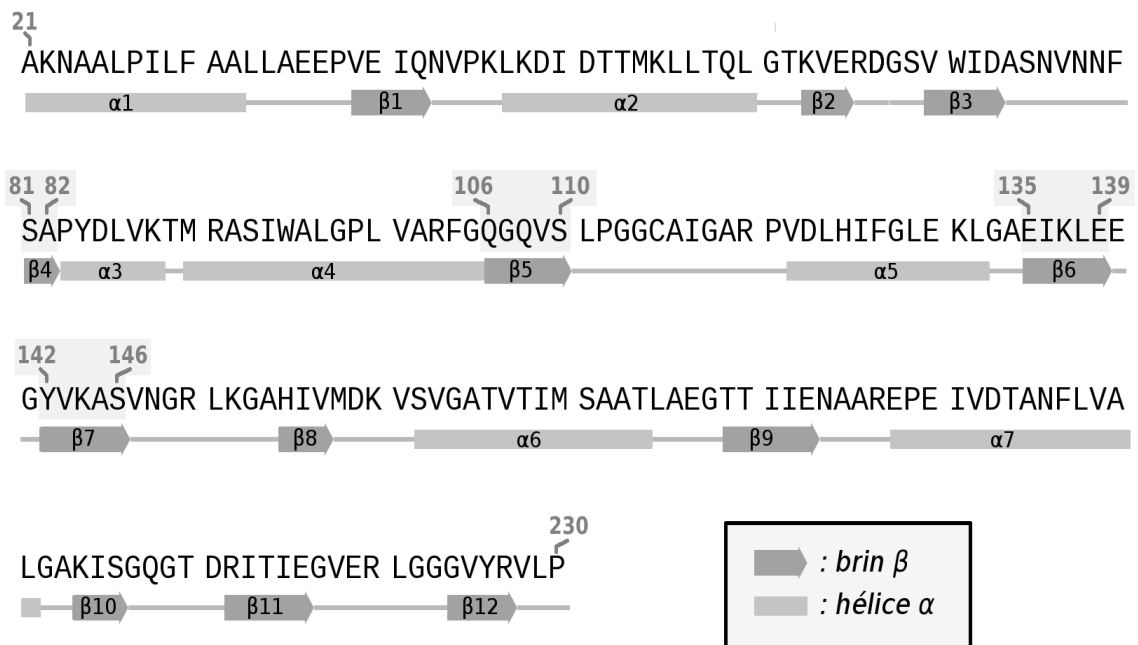


Exercice 1

La protéine MurA est une enzyme essentielle pour la synthèse du peptido-glycane (ou muréine, une substance constituant la paroi bactérienne).

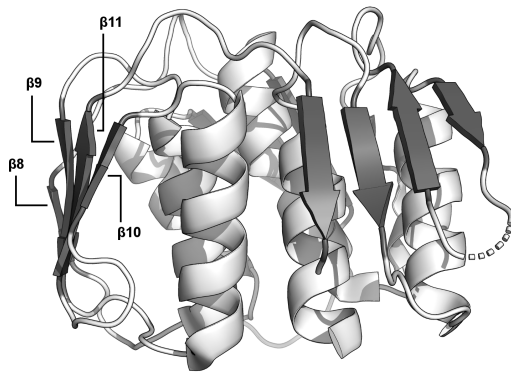
Chez la bactérie *Enterobacter cloacae*, la protéine MurA est constituée par 419 acides aminés formant deux domaines globulaires. On s'intéresse ici à un seul de ces domaines (celui formé par les résidus numéro 21 à 230). Par des techniques de génie génétique, on a produit une protéine constituée uniquement par ce domaine, dont la séquence et structure sont affichées dans les figures suivantes :



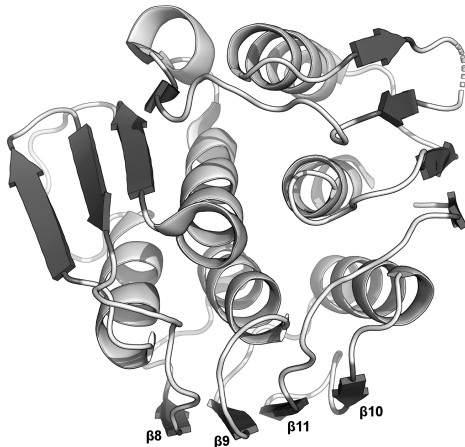
Séquence du domaine 21–230 de la protéine MurA de *E. cloacae*.



vue de face du feuillet $\beta 8$ - $\beta 9$ - $\beta 11$ - $\beta 10$



vue de côté du feuillet $\beta 8$ - $\beta 9$ - $\beta 11$ - $\beta 10$



vue de dessus

Structure du domaine 21–230 de la protéine MurA de *E. cloacae*.

La structure est constituée par un cœur d'hélices α et trois feuillets β extérieurs (ces derniers sont disposés de manière à faire « adhérer » une de leurs faces au cœur de la structure). Le feuillet β formé par les brins 8, 9, 10 et 11 est indiqué explicitement dans la figure.

Pour chaque question justifier vos réponses.

Q1

Faire un schéma (sur le modèle de la diapositive 68 du diaporama « Peptides et Protéines ») des deux faces du feuillet formé par les brins β 8,9,10,11.

Dans le schéma, indiquer le noms et numéros des acides aminés dont les chaînes latérales se trouvent sur une face donnée, en sachant que les chaînes latérales de V₁₅₇, I₁₈₁, T₂₁₄ et S₂₀₆ se trouvent toutes sur la même face du feuillet.

~~Indiquer aussi, les noms et numéros des acides aminés (faisant partie des brins β 8,9,10,11) et dont les chaînes latérales s'agenceraient de manière à s'insérer entre les atomes de la chaîne principale de deux brins adjacents.~~

Dans le schéma, préciser quelle est la face intérieure et quelle est la face extérieure du feuillet.

Q2

Quelle est à pH 8,5 la charge nette présente globalement :

- ▷ sur la face extérieure de ce feuillet β ?
- ▷ sur la face intérieure du feuillet ?

Q3

Quelles seraient, en revanche, les charges sur les deux faces du feuillet à pH 5 ?

(remarque : on suppose ici que le changement de pH n'entraîne pas de changements dans la structure tertiaire de la protéine)

Q4

À quel valeur de pH 50 % de molécules de MurA présenteraient une charge nette +1 sur ce feuillet, tandis que les autres 50 % présenteraient une charge nulle ?

Q5

Serait-il possible que, dans la protéine MurA, les acides aminés suivants établissent des liaisons hydrogène entre leurs chaînes latérales ?

- a) $H_{155} \cdots S_{206}$
- b) $H_{155} \cdots I_{181}$
- c) $T_{179} \cdots T_{180}$

Q6

Quelles seraient (en termes de stabilité de la structure du domaine 21-230) les conséquences de l'ajout d'une quantité modérée de β -mercaptoéthanol à un échantillon de protéine MurA ?

Q7

Faire une estimation approximée de la taille (en Å) du domaine 21-230 de la protéine MurA en calculant la longueur de l'hélice α la plus longue présente dans la structure.

Q8

Serait-il possible d'obtenir (en utilisant un séquenceur automatique basé sur la méthode d'Edman) les séquences complètes de tous les fragments peptidiques obtenus suite au traitement de MurA avec de la chymotrypsine ?

Q9

Un échantillon du domaine 21-230 de la protéine MurA, purifié et concentré, est gardé dans un tampon à pH 8,5. Des mesures d'absorbance à 280 nm montrent que la densité optique de cet échantillon est égale à 0.915.

Pour réaliser les calculs tenir compte des considérations et approximations suivantes :

- la masse molaire moyenne d'un acide aminé dans une protéine est de 110 g/mol ;
- les mesures de densité optique (absorbance) sont réalisées en plaçant 1 mL d'échantillon dans une cuvette d'1 cm d'épaisseur ;
- les coefficients d'extinction molaire de F, Y et W à 280 nm sont :
 - $\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{F}) = 0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 - $\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{Y}) = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 - $\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{W}) = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- on supposera que ces coefficients sont additifs et indépendants de l'environnement chimique de chaque acide aminé ;
- on supposera que le tampon de stockage utilisé et les autres acides aminés présents dans la protéine n'absorbent pas significativement la lumière UV à 280 nm.)

a) calculer la concentration de la protéine présente dans l'échantillon en mol/L et mg/mL ;

b) calculer la masse de protéine (en μg) présente dans 5 μL d'échantillon ;

c) quelle serait la concentration de la protéine (en mol/L) si le pH était 7 (les autres conditions restant inchangées) ?

d) quelle serait la densité optique du même échantillon après hydrolyse acide prolongée ? (en supposant que ce traitement ne dilue pas l'échantillon)

Exercice 2

La composition brute en acides aminés d'un peptide P est :

1 K, 1 R, 1 N (ou D), 1 S, 1 Q (ou E), 1 P, 1 G,
1 A, 1 V, 2 M, 1 I, 1 F, 1 W

La charge nette de P est +1 à pH 6,4.

Après traitement de P par ~~le DNFB~~
isothiocyanate de phényle puis par acide
trifluoroacétique (TFA), on obtient ~~DNP-A~~
PTH-A.

L'hydrolyse de P par la trypsine donne 3
peptides dont la composition brute en AA est :

T_1 : 1 K, 1 Q (ou E), 1 P, 1 G, 1 V, 1 W, 1 M

T_2 : 1 R, 1 S, 1 A, 1 M, 1 F

T_3 : 1 N (ou D), 1 I

T_1 absorbe à 280 nm. La charge nette de T_3
est de -1 à pH 6.4.

L'hydrolyse de P par la chymotrypsine donne 3
peptides dont la composition brute en AA est :

CT_1 : 1 R, 1 V, 1 M, 1 W

CT_2 : 1 K, 1 N (ou D), 1 Q (ou E), 1 P, 1 G,
1 M, 1 I

CT_3 : 1 S, 1 F, 1 A

L'hydrolyse de P par le bromure de cyanogène donne 3 peptides BC1, BC2 et BC3. La composition brute en acides aminés de deux de ces peptides est :

BC_1 : 1 R, 1 Q (ou E), 1 W, 1 V,
1 homoséryl lactone.

BC_2 : 1 K, 1 N (ou D), 1 P, 1 G, 1 I

(rem. : les méthionines se transforment en homoséryl lactones suite au traitement avec bromure de cyanogène)

Traité par le ~~DNFB~~ isothiocyanate de phényle puis ~~hydrolysé par HCl~~ par acide trifluoroacétique (TFA), BC_2 donne le ~~DNP-G~~ PTH-G. Le traitement de BC_2 par la carboxypeptidase donne d'abord D.

Quelle est la séquence de P ?

Justifier votre réponse