

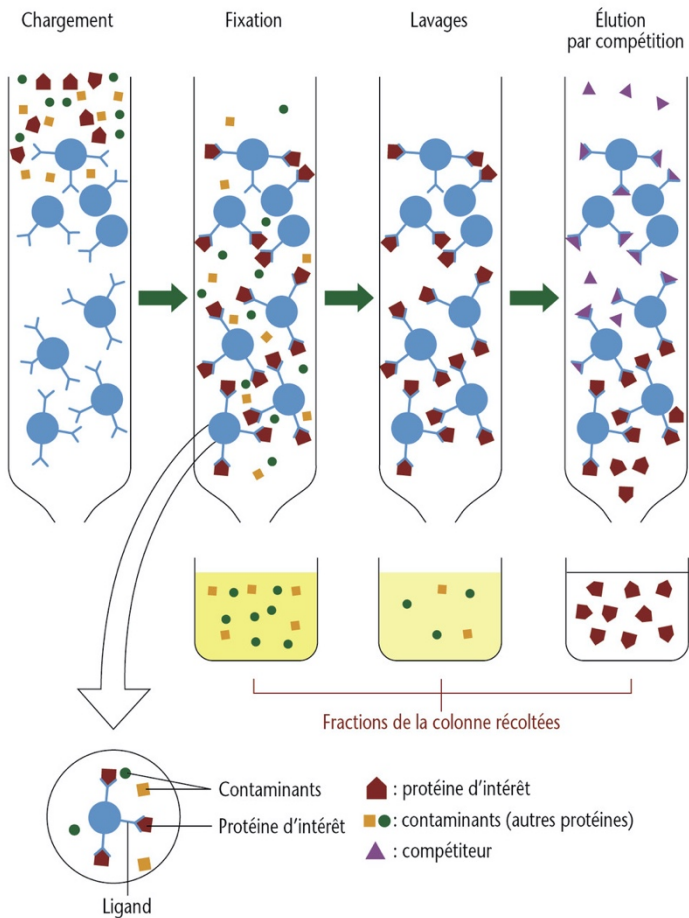
SV-D-2 TP : ETUDE D'UNE PROTEINE, L'HEMOGLOBINE - CORRIGE

I. Structure moléculaire de l'hémoglobine

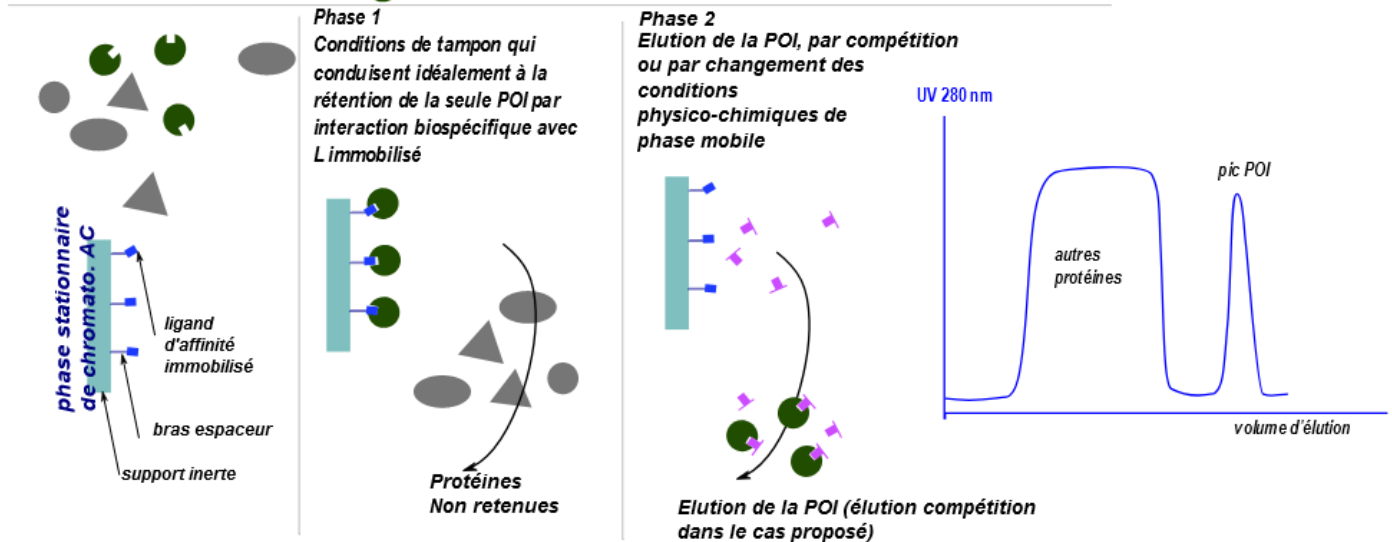
A) Purification d'Hb par chromatographie affinité

L'hémoglobine = Hb (protéine d'intérêt sur le dessin) se fixe sur la colonne (sur le polyanion = une molécule avec de nombreuses charges négatives). Le lavage permet de ne garder que la molécule fixée sur le gel = Hb. L'anion ajouté ensuite se fixe sur Hb qui ne se fixe plus sur le polyanion (compétition entre les deux) et est libérée de la colonne : cela permet de purifier Hb.

Rem : on aurait pu fixer des anticorps spécifiques de Hb sur le gel de la colonne pour avoir le même résultat.



Protéine d'intérêt = POI = 



2. Le volume d'élution représente la quantité de liquide qui passe à travers la colonne, on regarde donc au cours du temps ce qui sort de la colonne (mesuré par absorbance). Le premier pic très large correspond à toutes les protéines issues du lavage.

B) Caractérisation de la structure moléculaire de l'hémoglobine

- Interpréter les résultats du document 2. Conclure sur la structure de la protéine hémoglobine.
- A l'aide des données de modélisation moléculaire du document 3, caractériser la structure moléculaire de l'hémoglobine.

Electrophorèse en conditions dénaturantes d'hémoglobine donc migration **uniquement en fonction de la masse moléculaire** (la molécule perd sa structure 3D par chauffage et est recouverte de DS chargé négativement. Les éventuels ponts S-S sont éliminés également).

Comparaison avec le marqueur de masse moléculaire : bande de masse moléculaire d'environ 17kDa - Hb native a une masse moléculaire de 68 kDa : on peut donc en conclure que Hb est une protéine en structure IV, formée de 4 protomères = globines de 17kDa ($4 \times 17 = 68$).

Libmol : assemblage de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes alpha (de 141 aa) et 2 chaînes bêta (de 146 aa).

Conformation globulaire, hélices alpha

Chaque globine possède un hème : site d'interaction avec un ligand, le dioxygène.

Vous pouvez tester sur **libmol.org** en choisissant comme mot clé : **hémoglobine humaine désoxygénée ou oxygénée** (<https://libmol.org/?libmol=52>).

II. Etude d'une maladie génétique de l'hémoglobine : la drépanocytose ou anémie falciforme.

- Comparer l'électrophorèse en conditions natives des 2 hémoglobines.
- Sachant que le profil d'électrophorèse en SDS-PAGE est identique pour HbA et HbS, que pouvez-vous en déduire sur la différence entre HbA et HbS ?

HbS et HbA ne migrent pas à la même vitesse lors d'une électrophorèse en conditions natives : elles diffèrent en charge ou en masse moléculaire.

HbS et HbA protéines migrent à la même distance lors d'une électrophorèse en conditions dénaturantes, elles ont donc le même poids moléculaire (ou des poids moléculaires très voisins, ne permettant pas d'expliquer la différence de migration vue sur l'électrophorèse native).

L'analyse de l'électrophorèse en conditions natives permet ainsi de supposer que HbS et HbA diffèrent en termes de charge : HbA a une charge électrique nette plus négative que HbS.

Hypothèse : la séquence d'HbA et HbS doit légèrement différer (charge positive supplémentaire ou charge négative en moins dans la séquence d'HbS par rapport à HbA). On peut supposer une mutation ponctuelle par substitution.

7. Caractériser la différence entre HbA et HbS.

Le séquençage peptidique révèle le remplacement d'un glutamate par une valine. Mutation ponctuelle par substitution dans la séquence de bases azotées.

8. A l'aide du formulaire de biochimie, identifier les différences de propriétés entre le glutamate (Glu) et la valine (Val).

A pH 8,6, le glutamate (acide aminé polaire chargé) est chargé négativement tandis que la valine (acide aminé hydrophobe) n'a pas de charge électrique. Ceci explique la différence de migration en conditions natives.

9. A l'aide des données de modélisation moléculaire (document 6), caractériser la conformation globale d'HbS et la comparer avec celle d'HbA. Proposer une interprétation.

Formation de liaisons entre deux hélices.

Interactions possibles entre Val6 hydrophobes et d'autres aa hydrophobes.

10. En bilan, expliquer la formation de fibres d'HbS chez les individus drépanocytaires.

Les protéines d'HbS sont fibreuses et non pas globulaires comme HbA. Le diamètre de 22 nm nous indique que plusieurs hémoglobines interagissent ensemble pour former ces fibres (diamètre d'HbA : 6 nm).

HbS est capable de former des polymères de type fibrillaires par interactions hydrophobes grâce à la valine positionnée en surface.

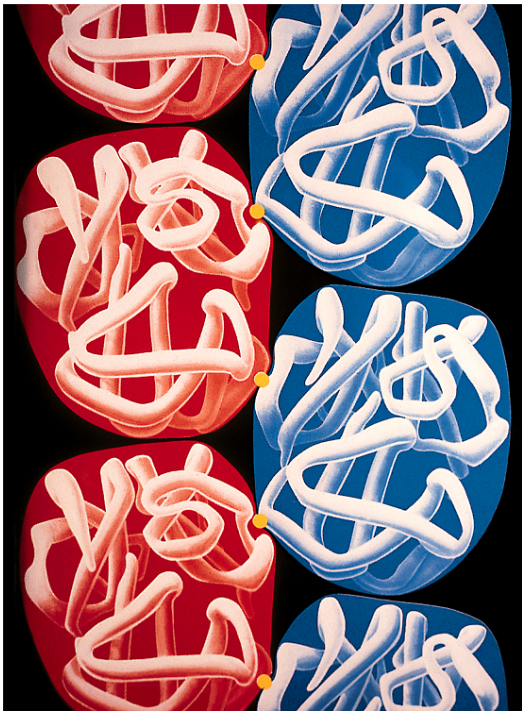
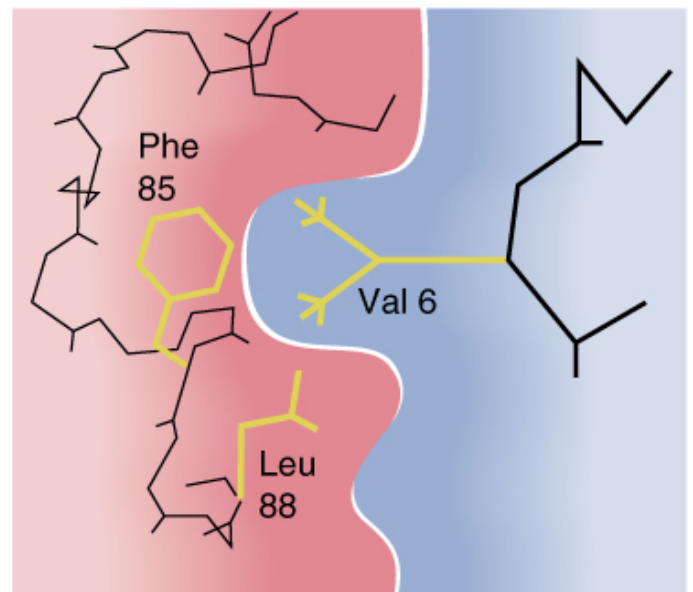
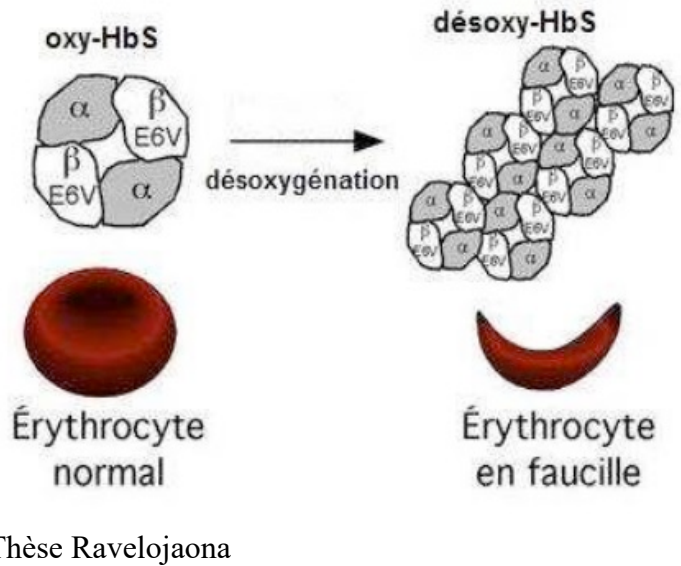
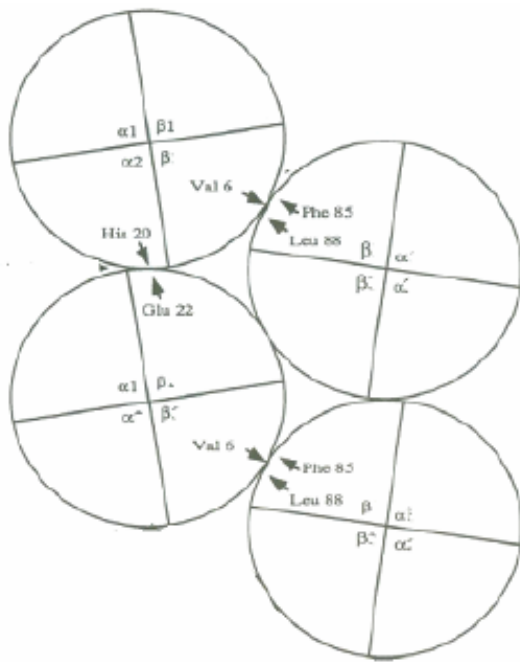


Figure copyrighted © by Irving Geis.



(b)

Figure copyrighted by Irving Geis.
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



III. Physiopathologie de la drépanocytose

11. Quel ligand de l'hémoglobine est mis en évidence par ce document 8 ? O₂
12. A l'aide des données de modélisation moléculaire (document 9), identifier le site de fixation de ce ligand sur l'hémoglobine. Le Fer
13. Comparer les propriétés de fixation du dioxygène pour HbA et HbS. Quelles sont les conséquences pour les individus drépanocytaires ?

Pour HbS : augmentation de la P₅₀ / déplacement de la courbe de saturation vers la droite

⇒ Diminution du pouvoir oxyphorique de l'hémoglobine (moins bonne charge en O₂ dans les poumons, mais meilleure libération dans les tissus périphériques), essoufflement plus rapide.

14. En utilisant le document 10, expliquer les conséquences de la circulation des hématies falciformes dans les capillaires sanguins.

Obstruction des capillaires : vaso-occlusion ⇒ interruption de l'apport sanguin, nécrose par anoxie, forte douleur dans les membres, notamment aux extrémités.

15. Analyser les résultats du document 11.

Dans le plasma, les hématies falciformes adhèrent 2 fois plus que les hématies normales aux parois des vaisseaux sanguins.

16. Quelles sont les conséquences pathologiques pour les individus drépanocytaires ?

Ralentissement du flux sanguin, hypoxémie locale (ce qui favorise aussi la formation de fibres d'HbS). Amplifie l'obstruction des capillaires.

17. A l'aide d'un schéma, expliquer le principe de l'expérience du document 11 A. Analyser les résultats et conclure.

Les anticorps bloquent les interactions éventuelles avec les hématies ⇒ expérience de compétition.

L'adhérence endothéliale des hématies falciformes nécessite les protéines VCAM-1 et $\alpha_4\beta_1$

18. Dans l'expérience 11 B, quel est l'intérêt de l'immunomarquage de l'actine ? Analyser les résultats et conclure.

Immunomarquage de l'actine (cytosquelette) : localisation des cellules endothéliales. VCAM-1 est exprimée sur les cellules endothéliales. Intégrine $\alpha_4\beta_1$ exprimée sur les cellules précurseurs des hématies.

Bilan : représenter sur un schéma bilan les caractéristiques de la drépanocytose aux différentes échelles

D'après thèse Ravelojaona, p20. **Attention allèle et non gène β^S**

