

**Exercice 1 (6 points)** : Il est possible de doser simultanément par spectroscopie UV-Visible le cobalt et le nickel dans une solution aqueuse en se basant sur l'absorption des complexes de ces métaux avec le quinolinol-8. Les coefficients d'absorption molaire (en  $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$ ) sont  $\epsilon_{Co} = 3529$  et  $\epsilon_{Ni} = 3228$  à 365 nm, et  $\epsilon_{Co} = 428,9$  et  $\epsilon_{Ni} = 0$  à 700 nm .

Questions : Calculer la concentration en nickel et en cobalt dans une solution indiquant une absorbance de 0,814 à 365 nm et 0,056 à 700 nm (cellules de 1 cm).

D'après la loi de Beer Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$$

Où  $\epsilon$  est un coefficient caractéristique de la substance appelé coefficient d'absorbance ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ),  $l$  est l'épaisseur de la cuve ( $cm$ ) et  $C$  la concentration de la solution ( $mol/L$ ).

A chaque niveau d'absorbance : (échantillon) =  $\epsilon \cdot l \cdot C$  du Co +  $\epsilon \cdot l \cdot C$  du Ni (1 points)

Donc en appliquant, nous avons :

$$\text{à } 365 \text{ nm} : 0,814 = 3529 \cdot C_{Co} + 3228 \cdot C_{Ni} \text{ (1 points)}$$

$$\text{à } 700 \text{ nm} : 0,056 = 428,9 \cdot C_{Co} + 0 \cdot C_{Ni} \text{ (1 points)}$$

$$C_{Co} = 0,056/428,9 = \mathbf{0,13 \cdot 10^3 \text{ mol/L}} \text{ (1.5 points)}$$

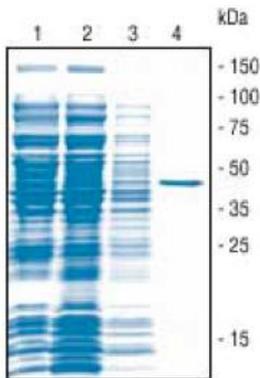
$$0,814 = (3529 \cdot 0,13 \cdot 10^3) + (3228 \cdot C_{Ni})$$

$$0,354 = 3228 \cdot C_{Ni}$$

$$C_{Ni} = 0,354/3228$$

$$C_{Ni} = \mathbf{0,109 \cdot 10^3 \text{ mol/L}} \text{ (1.5 points)}$$

**Exercice 2 (7 points) :** L'expression d'une protéine dans une bactérie (*Escherichia coli* le plus souvent) permet l'obtention d'un taux élevé de protéines pures. Le plasmide pET-15 de la société Novagen permet l'expression inductible de protéines recombinantes porteuses d'une extension N-terminale de 6 résidus histidine (His). Cette séquence poly-His est capable de se lier à des ions nickel divalents ( $\text{Ni}^{2+}$ ) immobilisés sur un gel de cellulose ou d'agarose. Un extrait bactérien brut, après induction de l'expression de la protéine recombinante, peut être chargé directement sur une colonne contenant ce type de résine, et après une étape de lavage, la protéine retenue peut être éluée par de l'imidazole. Cette résine peut être régénérée et réutilisée.



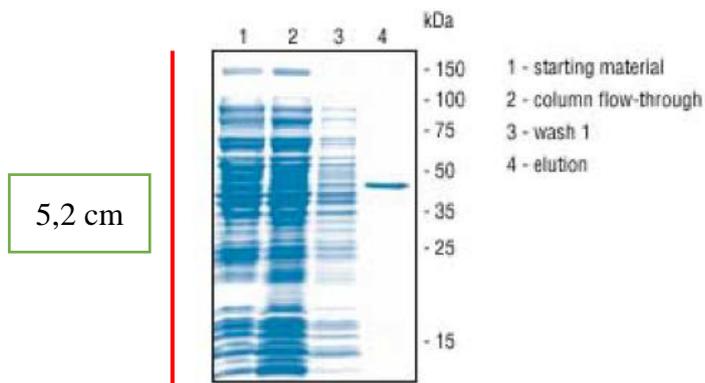
La figure représente un gel SDS-PAGE coloré par le bleu de Coomassie, où l'on a séparé les échantillons suivants :

- 1 - Lysat brut de bactéries transfectées par le plasmide pET-15 contenant un insert d'ADNc
- 2 - Protéines non retenues sur la colonne
- 3 - Lavage
- 4 - Protéine éluée

Questions : 1 - Quel est le type de chromatographie utilisé ? Expliquer le principe.  
2 - Commenter le gel SDS-PAGE. Déterminer la masse moléculaire de la protéine éluée.

- 1- Chromatographie échangeuse d'anions (1.5 points), la résine étant chargée positivement, seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci. Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées immédiatement (c'est le « non-fixé ». (0.75 points)  
L'éluion des molécules fixées peut alors être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'éluion contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine. On peut, soit utiliser directement un tampon contenant une forte concentration en ions (pour éluer toutes les molécules d'un coup), ou, au contraire, augmenter progressivement la concentration ionique (on parle de gradient) ce qui permet de décrocher successivement les différentes molécules en fonction de la force de leurs interactions électrostatiques (0.75 points).

2-



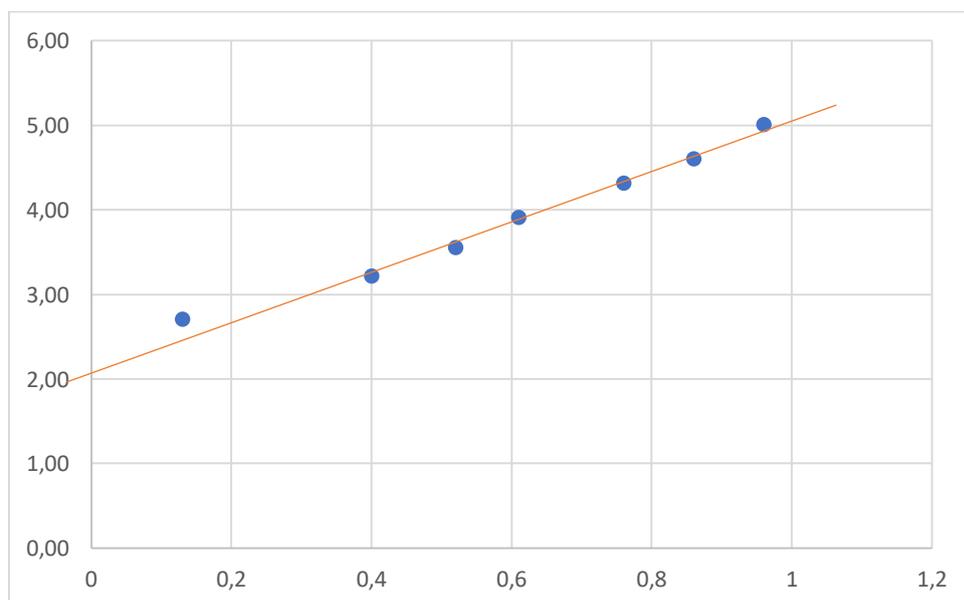
La mobilité relative est le rapport =

distance de migration d'une bande

-----  
distance de migration du front de migration (5,2 cm)

Log (bande)	D
5.01	0,96
4.61	0,86
4.32	0,76
3.91	0,61
3.56	0,52
3.22	0,4
2.71	0,13

(1.5 points)



**Graphe : (1.5 points)**

Logarithme 3.8 = 44,7 KD (1 points)

**Ou bien**

Logarithme 3.75 = 42.5 KD

**Exercice 3 (7 points) :** A l'aide d'un spectrophotomètre, on réalise une série de mesures d'absorbance A d'une solution X, à la longueur d'onde  $\lambda = 580$  nm la cuve a une épaisseur de 1,00 cm. On obtient les résultats suivants en fonction de la concentration massique  $\rho$  des solutions.

$\rho$ (g.l <sup>-1</sup> )	$0,60 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \cdot 10^{-3}$	$2,40 \cdot 10^{-3}$	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	$6,00 \cdot 10^{-3}$
A	0,075	0,250	0,420	0,515	0,775	1,040

**Données : X : C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>CIN<sub>3</sub>      M = 408,19 g.mol<sup>-1</sup>**

- 1) Quel est le critère de choix de la longueur d'onde à laquelle s'effectuent les mesures ? Pourquoi ? 2) Montrer que la loi de Beer-Lambert est vérifiée pour cette série de solutions.
- 3) Déterminer la valeur du coefficient d'absorption molaire de X obtenue à partir de cette série de mesures.
- 4) La mesure de l'absorbance d'une solution de X de concentration inconnue, réalisée dans les mêmes conditions donne A = 0,531. Déterminer la concentration molaire C de cette solution. En déduire sa concentration massique.

$A = \log(I_0/I) = \epsilon l c$  ( A est l'absorbance ou densité optique)

où  $\epsilon$  est un coefficient caractéristique de la substance appelé coefficient d'absorbance (L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), l est l'épaisseur de la cuve (cm) et c la concentration de la solution (mol/L).

- 1- La solution X présente une longueur d'onde lumineuse où l'absorption est maximale (0.5 points). Cette longueur d'onde maximale  $\lambda_{\max}$  ne dépend pas de la concentration, c'est une grandeur caractéristique de l'ion absorbant. Elle est utilisée pour effectuer les mesures photométriques sur des solutions de différentes concentrations. (0.5 points)

2-

$r \text{ gL}^{-1}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
A	0,075	0,25	0,42	0,515	0,775	1,04
$r/A \text{ gL}^{-1}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$5,76 \cdot 10^{-3}$

$r/A$  étant à peu près constant, la loi de Beer est vérifiée. (2 points)

**Ou bien :** On trace la courbe  $A = f(C)$ , on obtient une droite qui passe par l'origine, donc la loi de Beer Lambert est vérifiée.

3-  $r/A = 5,8 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ .

$$C/A = 5,8 \cdot 10^{-3} / \text{masse molaire (g/mol)} = 5,8 \cdot 10^{-3} / 408,19 = 1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L} = 1,42 \cdot 10^{-2} \text{ mol m}^{-3}.$$

$$r/A = 1 / (el) \text{ avec largeur } l = 10^{-2} \text{ m ;}$$

$$1,42 \cdot 10^{-2} = 1 / (10^{-2} e) = 100 / e \text{ soit } e = 100 / 1,42 \cdot 10^{-2} = 10^4 / 1,42 = 7042 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}.$$

**Ou bien :**  $1,42 \cdot 10^{-5} = 1 / (1 * e)$  soit  $e = 1 / 1,42 \cdot 10^{-5} = \underline{70420 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}}$ . (2 points)

4- si  $A = 0,531$  alors  $C/A = 1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$  soit  $C = 0,531 * 1,42 \cdot 10^{-5} = 7,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$

**Ou bien :**  $A = \log(I_0/I) = elc$  ( A est l'absorbance ou densité optique)

$$C = A/e = 0,531 / 70420 = 7,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L (1 points)}$$

$$r = 7,54 \cdot 10^{-6} * 408,19 = \underline{3,08 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}}. (1 points)$$