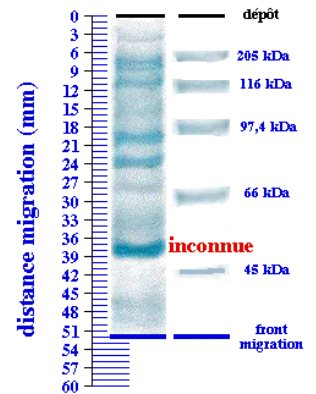


EMD TAB 2025-2026

Exercice 1 (5 points) :

A. Rappeler le principe de l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes.

- Les protéines sont **dénaturées** par un détergent anionique (le **SDS**, dodécylsulfate de sodium) et souvent par un agent réducteur (β -mercaptoéthanol ou DTT) (0.5).
- Le SDS se fixe le long de la chaîne polypeptidique, ce qui :
 - détruit la structure tridimensionnelle de la protéine, (0.25).
 - confère à toutes les protéines une **charge négative proportionnelle à leur masse** (0.25).



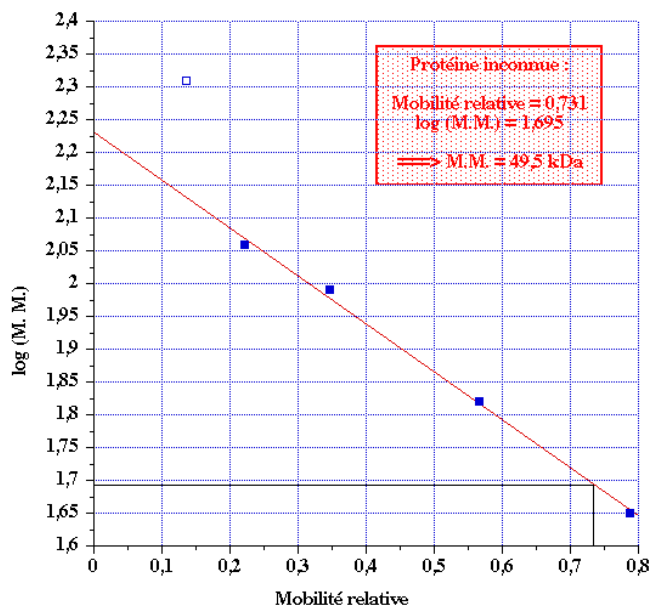
Lors de la migration dans un gel de polyacrylamide soumis à un champ électrique, les protéines se séparent **uniquement en fonction de leur masse moléculaire** :

- les **plus petites migrent plus rapidement**, (0.5).
- les **plus grosses migrent plus lentement**. (0.5).

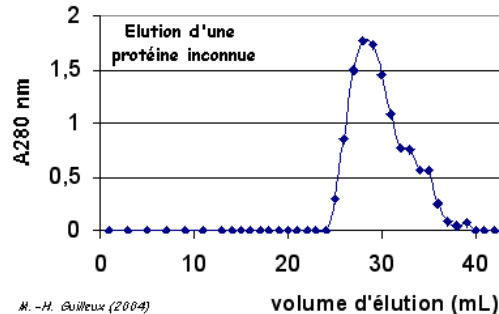
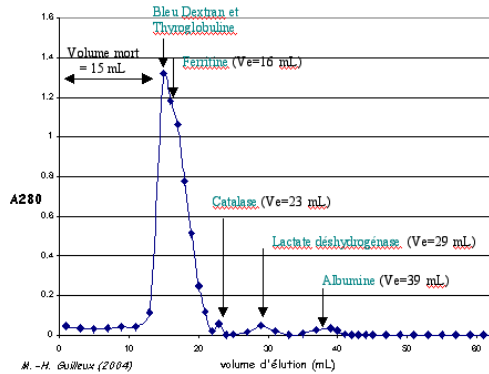
B. A partir du profil électrophorétique ci-dessous, calculez la masse molaire de la protéine inconnue 3 points.

Graphes : (2 points)

PM=49.5 kDa (1 points)



Exercice 02 (7 points) : Le gel de chromatographie (filtration sur gel ou tamis moléculaire) Superdex G200 a été calibré avec les protéines standard suivantes : thyroglobuline (669 kDa), ferritine (440 kDa), catalase (232 kDa), lactate déshydrogénase (140 kDa), albumine (66 kDa). Bleu Dextran : volume mort $V_0 = 15$ mL. Le profil d'élution est présenté dans la **figure 1**.



Tracer la droite étalon : $V_e / V_0 = f \log (\text{masse molaire})$.

A. Pourquoi la thyroglobuline est-elle éluée avec le Bleu Dextran ?

- Le **Bleu Dextran** sert à mesurer le **volume mort V_0** (0.5).
- La **thyroglobuline (669 kDa)** est :
 - **plus grande que les pores du gel Superdex G200** (0.25).
 - **ne pénètre pas dans les billes** (0.25)
- Elle est éluée au volume mort V_0 , comme le **Bleu Dextran** (0.5)

B. Quelle technique est utilisée pour suivre l'élution des protéines ? Pourquoi ?

- Spectrophotométrie UV à 280 nm (1 points)

Pourquoi ?

- Les protéines contiennent :
 - **Tryptophane (0.25).**
 - **Tyrosine (0.25).**
 - **Phénylalanine (0.25).**
- Ces acides aminés absorbent à 280 nm (0.25)

C. A partir du droit étalon, déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue dont le profil d'élution obtenu dans les mêmes conditions est présenté dans la **figure 2.**

Graphe : (2 points)

PM : (1 points)

Exercice 03 (8 points) : La purification des invertases : le cas des invertases cytoplasmique (INV 1) et pariétale ionique (INV 2). Les différentes étapes sont résumées dans le tableau ci-dessous. Chaque fraction protéique a été testée en présence de saccharose pour déterminer son activité catalytique en unité enzymatique. La teneur en protéine (en mg) de chaque fraction a également été dosée à l'aide de la méthode de Bradford.

A) Pour chaque fraction, déterminez l'activité spécifique, le taux de purification et le rendement et cela pour les deux types d'invertase. Détaillez un exemple de calcul uniquement pour chaque paramètre et remplissez le tableau 1. **B)** Que pouvez-vous en déduire pour chaque étape de ce protocole de purification ?

INV 1 – Invertase cytoplasmique

Étape	Activité (μkatal)	Protéines (mg)	Activité spécifique	Taux purification	Rendement (%)
Broyage / solubilisation	1000	1250	0,80	1,00	100
Centrifugation 27 000 g	600	1034	0,58	0,73	60
Sulfate d'ammonium	570	792	0,72	0,90	57
Centrifugation 27 000 g	530	730	0,73	0,91	53
Chromatographie G-100	320	5,82	54,98	68,7	32
Chromatographie adsorption	208	1,30	160,0	200	20,8

INV 2 – Invertase pariétale ionique

Étape	Activité (μkatal)	Protéines (mg)	Activité spécifique	Taux purification	Rendement (%)
Broyage / solubilisation	318	353	0,90	1,00	100
Centrifugation 27 000 g	210	344	0,61	0,68	66
Sulfate d'ammonium	180	265	0,68	0,76	56,6
Centrifugation 27 000 g	172	215	0,80	0,89	54,1
Chromatographie G-100	90	3,10	29,03	32,3	28,3
Chromatographie adsorption	62	0,50	124,0	137,8	19,5

Tableau INV1 : (1.5 points)

Tableau INV2 : (1.5 points)

Détaillez un exemple de calcul (1 points)

Interprétation INV1 (2 points)

- L'invertase cytoplasmique a été purifiée 200 fois **(0.5)**
- Les protéines non enzymatiques ont été très largement éliminées **(0.5)**
- Les chromatographies sont responsables de l'essentiel de cette purification **(0.5)**

Conclusion indice de purification :

Le protocole permet une purification très efficace de l'INV1, avec un indice de purification totale de 200 (0.5 points).

Interprétation INV2 (2 points)

- L'INV2 est purifiée environ 138 fois **(0.5)**
- Le protocole est très efficace, surtout grâce aux chromatographies **(0.5)**
- Le rendement final (~19,5 %) reste acceptable pour une purification avancée **(0.5)**

Conclusion globale pour INV2

au cours du protocole en raison des pertes enzymatiques, tandis que l'indice de purification totale augmente fortement, atteignant environ 138, ce qui traduit une purification efficace de l'enzyme (0.5).

.