

## EMD TAB 2025-2026 remplacement

### Exercice 1 (4 points) :

Justifier l'ordre d'élution de ces trois protéines lors d'une chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex. (1pt)

A=

B+

C-

Ces trois protéines sont soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS).

Justifier le nombre de bandes attendues pour chacune des 3 protéines (1.5pt)

Protéine A : une bande 25000 da

Protéine B : une bande 50000da

Protéine C : une bande 50000da

Déterminer les masses molaires correspondant à ces bandes si on les compare à une courbe d'étalonnage obtenue avec des protéines de masses molaires connues (1.5 pt)

Protéine A : une bande 25 kda=25 103g/mol

Protéine B : une bande 50 Kda=50 103g/mol

Protéine C : une bande 50 Kda= 50 103g/mol

### Exercice 02 (4 points) :

- 1- De quel type d'électrophorèse le document 2 est-il le résultat ?  
Electrophorèse sur gel d'agarose ici électrophorèse d'ADN (1pt)
- 2- Comment obtient-on le résultat proposé par le document 1 ?  
Il s'agit d'une courbe étalon, on fait migrer des fragments de taille connue pour établir une relation entre la taille des fragments et leur distance de migration. (1,5)
- 3- Quelle information apporte la mise en relation des deux documents ?  
En reportant (traits rouges) la position du fragment inconnu sur le document 1, on obtient graphiquement sa taille soit 600 pb (paires de bases environ (1,5).

### Exercice 03 (4 points) :

1 - Proportion des groupements carboxyméthyls ( $pK_a = 4,76$ ) chargés négativement aux pH : 1, 4,76,7 et 9. Le pH est donné par la relation suivante :

$$pH = pK_a + \log \frac{(-CH_2-COO^-)}{(-CH_2-COOH)} \quad \begin{matrix} \text{base} \\ \text{acide} \end{matrix}$$

À pH = 1 :  $\log \text{Base}/\text{Acide} = pH - pK_a = 1 - 4,76 = -3,76$  donc :  $= 1,74 \cdot 10^{-4}$

Sachant que (A) + (B) = 100 % et que (B) =  $1,74 \cdot 10^{-4} \cdot A$

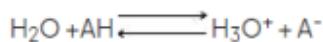
On en déduit que  $A + 1,74 \cdot 10^{-4} \cdot A = 100$       (A) est mis en facteur :  $A = 100 / (1 + 1,74 \cdot 10^{-4})$

On peut ainsi calculer le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = 99,98 % et (B) = 0,02 %

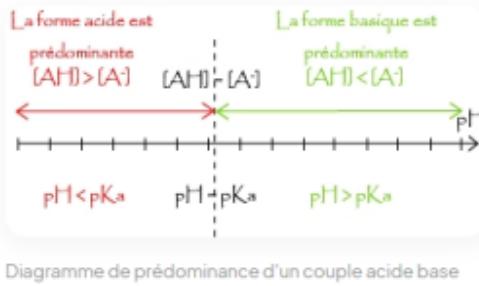
À pH = 4,76 : A = 50 % et B = 50 %

À pH = 7 : A = 0,575 % et B = 99,425 %

À pH = 9 : A = 5,73  $10^{-3}$  % et B = 99,994 %



Ces résultats peuvent être traduits par le diagramme de prédominance suivant :



2 - À pH = 7, on a pu calculer que la résine était à 99,425 % sous forme basique, chargée négativement (-CH<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup>).

Protéine :	pHi :	Charge à pH = 7 :
Ovalbumine	4,6	négative
Cytochrome c	10,65	positive
Lysozyme	11	positive

Ainsi, seule l'ovalbumine, qui à pH = 7 est chargée négativement, ne sera pas retenue sur la colonne. Le cytochrome c et le lysozyme seront retenus.

### Exercice 04 (12 points) :

#### 1-A)



L'activité de l'enzyme est déterminée par la mesure en conditions optimales, de la cinétique

de disparition à 340 nm du NADPH. Dans les conditions expérimentales, la diminution d'absorbance liée au NADH mesurée au spectrophotomètre est directement proportionnelle à l'activité de la LDH. (0,5)

#### 1-B)

a) vitesse initiale =  $\Delta (\text{NADH}) / \Delta t = (0,300 / (5 \times 2)) \times 10^6 / 6300 = 4,76 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (0,5)

soit une concentration catalytique de **4,76 U/L**. **(0,5)**

b) cette activité correspond à un ajout de 0,1 mg de protéines totales pour 2 mL ou 50 mg pour 1 L

Donc activité spécifique de  $A = 4,76 / 0,05 = 95 \text{ U/g}$  **(1)**

**1-C)**

Concentration catalytique de  $B = (0,358/2) \times 10^6 / 6300 = 28,4 \text{ U/L}$  **(1)**

- Cette activité correspond à un ajout de 1 µg de protéines totales pour 2 mL ou 500 µg pour 1 L

Donc activité spécifique de  $B = 28,4 / 500 \cdot 10^{-6} = 56800 \text{ U/g}$  **(1)**

**2-A)**

Le degré de purification =  $56800 / 95 = 598$  **(1)**

**2-B)**

Le bleu Cibacron à une structure proche du NAD qui est un cofacteur de la réaction impliquant la LDH **(1)**. C'est la chromatographie la plus sélective puisqu'il y a complémentarité entre ligand (bleu Cibacron) et la protéine (LDH). **(1)**