

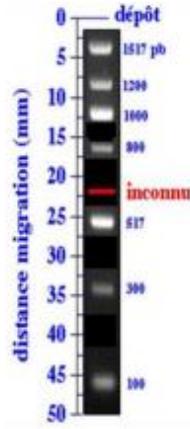
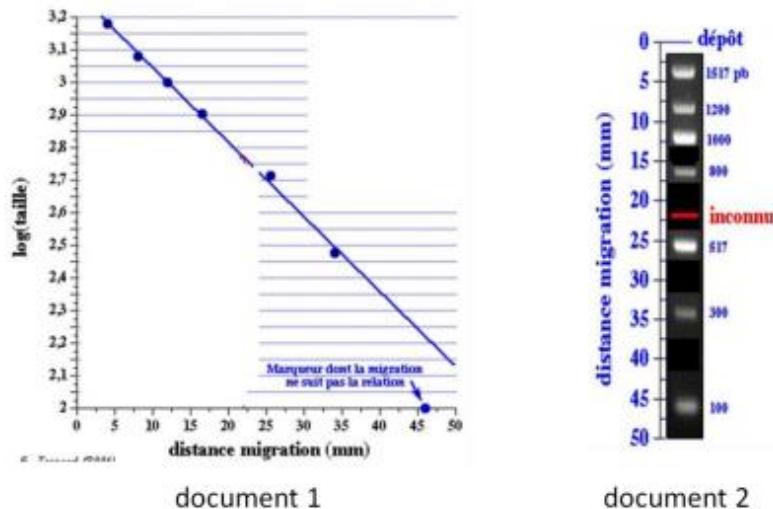
### EMD Remplacement TAB 2025-2026

**Exercice 01 (4 points) :** On dispose d'un mélange de 3 protéines A, B, C. La protéine A a une masse molaire de 100 000, est composée de 4 sous-unités identiques et possède un pH<sub>i</sub> de 7,0. La protéine B a une masse molaire de 50 000, comprend qu'une seule sous-unité et possède un pH<sub>i</sub> de 3,0. La protéine C a une masse molaire de 50 000, ne comprend qu'une seule sous-unité et possède un pH<sub>i</sub> de 10,0. Les trois protéines sont sphériques. On considère que les techniques sont réalisées à pH = 7.

- 1- Justifier l'ordre d'élution de ces trois protéines lors d'une chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex.
- 2- 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.
- 3- 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.

**Exercice 02 (4 points) :** Analyser et interpréter des résultats (mettre en relation des informations)

- 1- De quel type d'électrophorèse le document 2 est-il le résultat ?
- 2- Comment obtient-on le résultat proposé par le document 1 ?
- 3- Quelle information apporte la mise en relation des deux documents ?



**Exercice 03 (04 points) :** La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est un support échangeur de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyls (-CH<sub>2</sub>-COOH). Questions :

1 - Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyls chargés négativement aux pH suivants : 1 ; 4,76 ; 7 et 9 (on considérera que le pK<sub>a</sub> du groupement carboxyl des radicaux carboxyméthyls est 4,76).

2 - Parmi les protéines suivantes : Ovalbumine (pH<sub>i</sub> = 4,6), Cytochrome c (pH<sub>i</sub> = 10,65) et Lysozyme (pH<sub>i</sub> = 11), quelles sont celles qui sont retenues par la CM-cellulose à pH 7 ?

### Exercice 04 (08 points) :

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire contenue dans la plupart des tissus (myocarde, foie, rein, cerveau et muscle strié). La mesure de cette activité s'effectue en suivant l'oxydation du NADH<sub>H+</sub>. Cette réaction est catalysée par la LDH qui consomme du NADH<sub>H+</sub> en présence de pyruvate et abouti à la formation de NAD<sup>+</sup> et de lactate. L'objectif de ce travail est purifier une protéine, en l'occurrence la LDH à partir d'un extrait de tissu bovin

foetal au moyen d'une chromatographie d'affinité sur bleu Cibacron. Le volume réactionnel total est de 2 ml et tous les substrats de la réaction sont en concentration saturante pour l'enzyme. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans cuve 2 cm de trajet optique.

**Question 1 :** La mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut est effectuée à partir d'une prise d'essai contenant 0,1 mg de protéines totales. Après 5 min d'incubation, la variation d'absorbance du mélange lue à 340 nm est 0,300. La valeur du coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm est de 6300 M<sup>-1</sup> .cm<sup>-1</sup>

- A-** Donner le principe de la détermination de l'activité enzymatique.
- B-** Calculer la concentration catalytique de la LDH dans la cuve réactionnelle.
- C-** Calculer l'activité spécifique de la LDH dans l'extrait brut.

**Question 2 :** La première étape de purification est une chromatographie d'affinité bleu Cibacron. Elle permet d'obtenir un éluat B contenant l'activité LDH. La mesure de l'activité enzymatique de l'éluat B est effectuée à partir d'une prise d'essai contenant 1. 10<sup>-3</sup> mg de protéines totales. La variation de l'absorbance lue à 340 nm pendant 60 secondes d'incubation est de 0,358. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans cuve 2 cm de trajet optique. L'éluat B est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes. Une seule bande est observée de masse moléculaire apparente

- A-** Calculer le degré de purification de la LDH par l'étape de chromatographie d'affinité bleu Cibacron.
- B-** Quel est le rôle de bleu Cibacron lors de la chromatographie d'affinité