

INTERROGATION ORALE**Détermination d'une masse molaire par méthode chromatographique**

On détermine les temps de rétention (t_r) au cours d'une chromatographie sur résine Séphadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse molaire (M).

Le débit de la colonne est de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

	Masse molaire (kDa)	t_r (minutes)
Aldolase	145	10,4
Lactate deshydrogénase	135	11,4
Phosphatase alcaline	80	18,4
Ovalbumine	45	26,2
Lactoglobuline	37,1	28,6

2. Déterminer les volumes d'élution (V_e) de chaque protéine.

3. Présenter les manières permettant de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue, soumise au même système chromatographique, et dont le volume d'élution a pu être déterminé.

INTERROGATION ORALE**Détermination d'une masse molaire par méthode chromatographique**

On veut déterminer la masse moléculaire (M) d'une protéine X par chromatographie d'exclusion-diffusion. Le domaine de fractionnement du gel de résine se situe entre 40 000 et 400 000 Da.

1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.

L'étalonnage du gel de résine grâce à des standards, dont les masses molaires (exprimées en kDa) et les volumes d'élution (V_e , exprimés en mL) sont indiqués dans le tableau suivant :

	Masse moléculaire (kDa)	V_e (mL)
Dextran	2 000	45
Fibrinogène	340	60
Catalase	230	75
Lactoglobuline	19	132

2. Présenter les manières permettant de déterminer la masse moléculaire de la protéine X, soumise au même système chromatographique, et dont le volume d'élution a pu être déterminé.

INTERROGATION ORALE**Séparation d'acides aminés par chromatographie**

On veut séparer trois acides aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et la L-lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique greffée avec des groupements sulfonates ($-\text{SO}_3^-$).

Les pH isoélectriques à 25°C de l'acide L-glutamique, de la L-leucine et de la L-lysine sont respectivement :
3,22 — 5,98 — 9,74

1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.

On dépose ces trois acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

2. Expliquer et justifier l'ordre d'élution des acides aminés dans ce système chromatographique.

INTERROGATION ORALE**Séparation d'acides aminés par chromatographie**

On veut séparer trois acides aminés : l'acide aspartique, l'arginine et la leucine, par chromatographie sur une résine échangeuse de cations.

Les pH isoélectriques à 25°C de l'acide aspartique, de l'arginine et de la leucine sont respectivement :
2,87 — 10,76 — 6

1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.

L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon pH 6.

2. Expliquer et justifier l'ordre d'élution des acides aminés dans ce système chromatographique.

INTERROGATION ORALE

Séparation d'acides aminés par chromatographie

On veut réaliser la séparation de cinq acides aminés (Glu, Met, Tyr, Lys, Ser). On utilise pour cela une résine polystyrénique greffée avec des groupements sulfonates ($-\text{SO}_3^-$) que l'on dispose dans une colonne ouverte :

- 1) la résine est lavée par une solution d'acide chlorhydrique HCl en excès.
- 2) après ce traitement, la résine est lavée à l'eau distillée.
- 3) on fait alors passer une solution de NaCl en excès.

1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.

2. Indiquer le rôle des trois étapes de préparation de la colonne.

Les cinq acides aminés à séparer sont solubilisés dans un tampon pH 3,8 et sont déposés en haut de la colonne.

3. Indiquer, en justifiant, les acides aminés retenus sur la résine.

Après avoir chargé la colonne par les cinq acides aminés préalablement solubilisés dans le tampon à pH 3,8, l'élution est réalisée en gradient de pH , en augmentant le pH .

4. Justifier l'ordre d'élution des acides aminés.

Document :

	$pK_a(\alpha\text{-COOH})$	$pK_a(\alpha\text{-NH}_2)$	$pK_a(R)$
Acide glutamique	2,19	9,67	4,25
Méthionine	2,28	9,21	-
Tyrosine	2,20	9,11	10,07
Lysine	2,18	8,95	10,53
Sérine	2,21	9,15	-

INTERROGATION ORALE**Séparation de protéines par chromatographie**

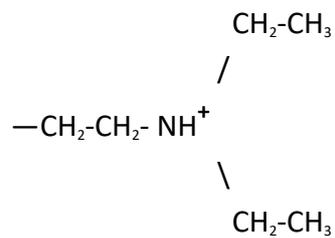
La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est une résine échangeuse de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyles ($-\text{CH}_2-\text{COO}^-$).

1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.
2. Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyles chargés négativement aux pH suivants :
1 — 4,76 — 7 — 9
(on considère que le pK_a du groupement carboxyle des radicaux carboxyméthyle est 4,76)
3. Parmi les protéines suivantes : Ovalbumine ($pH_i = 4,6$), Cytochrome c ($pH_i = 10,65$) et Lysozyme ($pH_i = 10,5$), indiquer, en justifiant, celles qui sont retenues par la CM-cellulose à pH 7.

INTERROGATION ORALE

Séparation de protéines par chromatographie

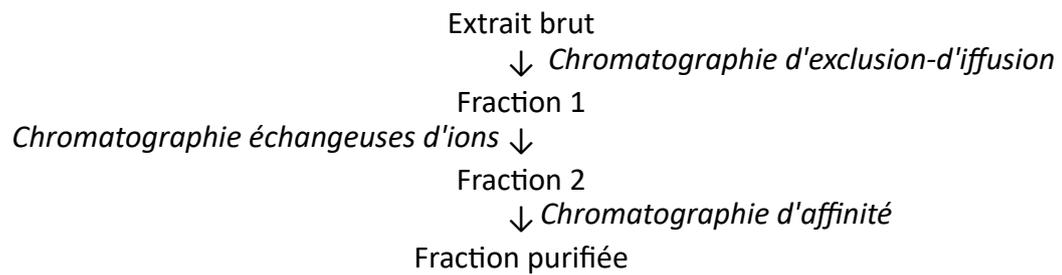
La diéthylaminoéthylcellulose (DEAE-cellulose) est une résine échangeuse d'anions. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements diéthylaminoéthyls :



1. Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.
2. Quelle est la proportion de radicaux-DEAE chargés positivement aux pH suivants :
 $2 - 7 - 9,4 - 12$
 (on considère que le pK_a de l'amine tertiaire du groupement DEAE est 9,4)
3. Parmi les protéines suivantes : Séralbumine ($pH_i = 4,9$), Uréase ($pH_i = 5$), Chymotrypsinogène ($pH_i = 9,5$), indiquer, en justifiant, celles qui sont retenues par la DEAE-Cellulose à pH 7.

INTERROGATION ORALE**Chromatographies et purification d'une enzyme**

Une enzyme a été purifiée en trois étapes chromatographiques :



Présenter en détails les méthodes chromatographiques mises en œuvre dans ce protocole de purification.

INTERROGATION ORALE**Chromatographie d'un mélange protéique et chromatogramme**

Un mélange d'immunoglobulines G (masse molaire $\approx 160\ 000$ Da) et d'albumine sérique bovine (masse molaire $\approx 67\ 000$ Da) est déposé sur une colonne de Séphadex G-100 ayant une limite d'exclusion de 100 kDa. L'élution est suivie par mesure des absorbances à $\lambda = 280$ nm des différentes fractions obtenues.

- 1.** Présenter en détail la méthode chromatographique mise en œuvre.
- 2.** Tracer un chromatogramme vraisemblable et indiquer, en justifiant, le volume mort V_0 .

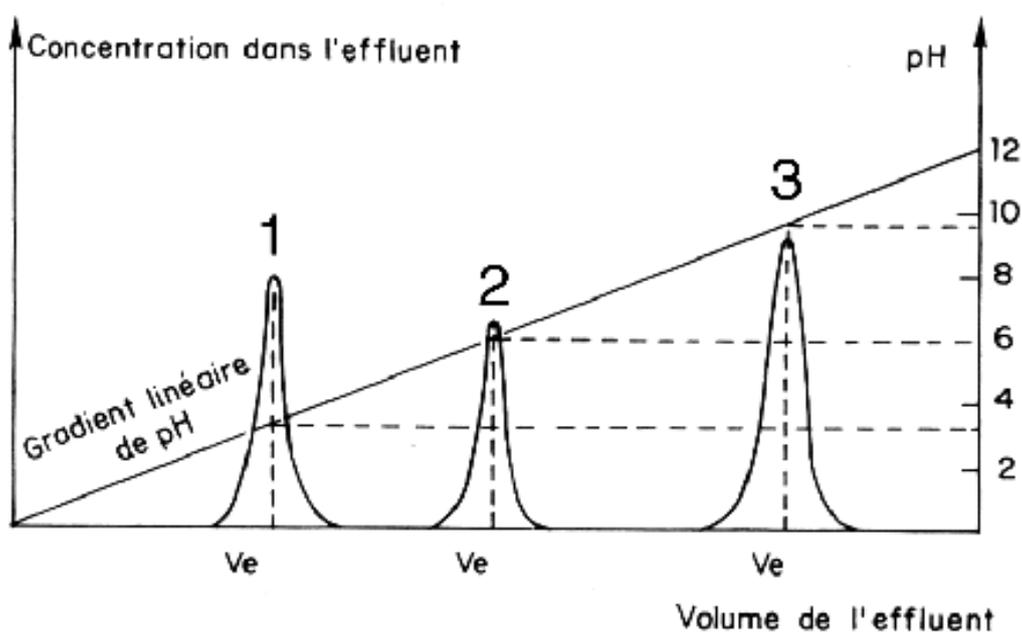
INTERROGATION ORALE

Séparation d'acides aminés par chromatographie

Trois acides aminés (1, 2 et 3) sont séparés par méthode chromatographique.

À l'aide des documents fournis et de vos connaissances, présenter la chromatographie mise en œuvre, puis déterminer, en justifiant, les acides aminés 1, 2 et 3.

Document n°1 : Profil d'élution des trois acides aminés 1, 2 et 3



Document n°2 : pH_i des acides aminés

	pH_i
Glycine	5,97
Alanine	6,02
Valine	5,97
Leucine	5,98
Isoleucine	6,02
Sérine	5,68
Thréonine	6,53
Cystéine	5,02
Méthionine	5,75
Acide aspartique	2,87

	pH_i
Asparagine	5,41
Acide glutamique	3,22
Glutamine	5,65
Lysine	9,74
Arginine	10,76
Histidine	7,58
Phénylalanine	5,98
Tyrosine	5,65
Tryptophane	5,88
Proline	6,10

INTERROGATION ORALE**Chromatographie d'une protéine recombinante**

L'expression d'une protéine dans une bactérie (*Escherichia coli* le plus souvent) permet l'obtention d'un taux de purification élevé.

Le plasmide pET-15 de la société Novagen permet l'expression inductible de protéines recombinantes porteuses d'une extension N-terminale de 6 résidus d'histidine (His).

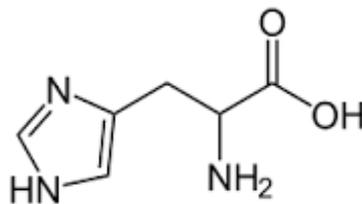
Cette séquence poly-His est capable de se lier aux cations divalents Ni^{2+} (Ni = nickel) immobilisés sur un gel de cellulose ou d'agarose.

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 un gradient d'imidazole.

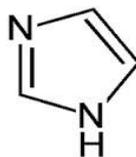
Cette résine peut être régénérée et réutilisée.

1. Indiquer, en justifiant, la méthode chromatographique mise en œuvre et la présenter en détail.
2. Justifier l'utilisation d'un gradient d'imidazole pour l'éluion des protéines recombinantes.

Document n°1 : Structure de l'histidine



Document n°2 : Structure de l'imidazole



INTERROGATION ORALE

Séparation des isomorphes de l'albumine du sérum humain en HPLC

Après avoir exposé le principe de la technique (HPLC) et de la méthode chromatographique utilisées, présenter les résultats obtenus et préciser le pH_i des quatre isomorphes de l'albumine du sérum humain (pics a, b, a' et b' du document n°3).

Document n°1 :

Les isomorphes d'une protéine sont des variantes de cette protéine, ils peuvent avoir des caractéristiques (masse molaire, pH_i , etc.) différentes, cependant, leur composition et leur rôles restent identiques.

Les différents isomorphes de l'albumine sérique humaine sont séparés en HPLC à l'aide d'une colonne TSK-Gel DEAE-5PW dont les caractéristiques sont présentées dans le document n°2.

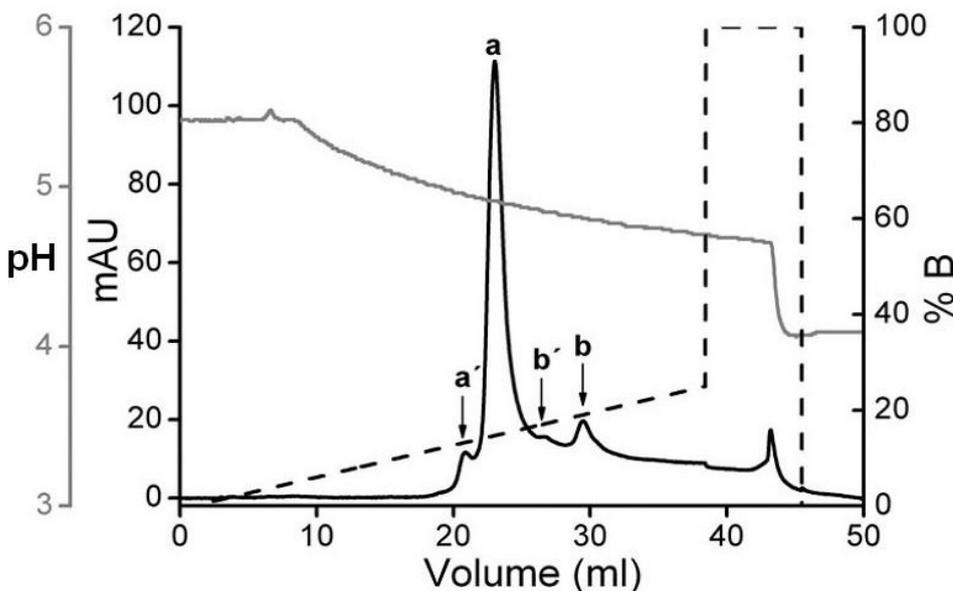
L'éluion des isomorphes est réalisée en gradient de pH grâce à un gradient des deux tampons :

- tampon A : $pH = 5,35$.
- tampon B : $pH = 3,95$.

Document n°2 : Caractéristiques de la colonne TSK DEAE 5PW utilisée en HPLC

Caractéristiques	Colonne TSK-Gel DEAE-5PW
Type de matrice de la colonne :	Résine hydrophile
Taille des particules de la colonne :	10 μm
Taille des pores de la colonne :	1 000 Å (100 nm)
Groupe fonctionnel greffé sur la colonne :	DEAE : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$
Contre-ion :	Cl^-
pH d'utilisation de la colonne :	de 2 à 12
Limite d'exclusion (PEG) de la colonne :	1 000 kDa
Capacité de la colonne :	30 mg de SAB·mL ⁻¹
pK_a de la colonne :	11,2

Document n°3 : Résultats obtenus avec les quatre isoformes de l'albumine sérique humaine



Légende :

- Trait plein noir : Absorbance à $\lambda = 280 \text{ nm}$
- Trait plein gris : pH
- Trait en pointillé : proportion de tampon B dans l'éluant

INTERROGATION ORALE

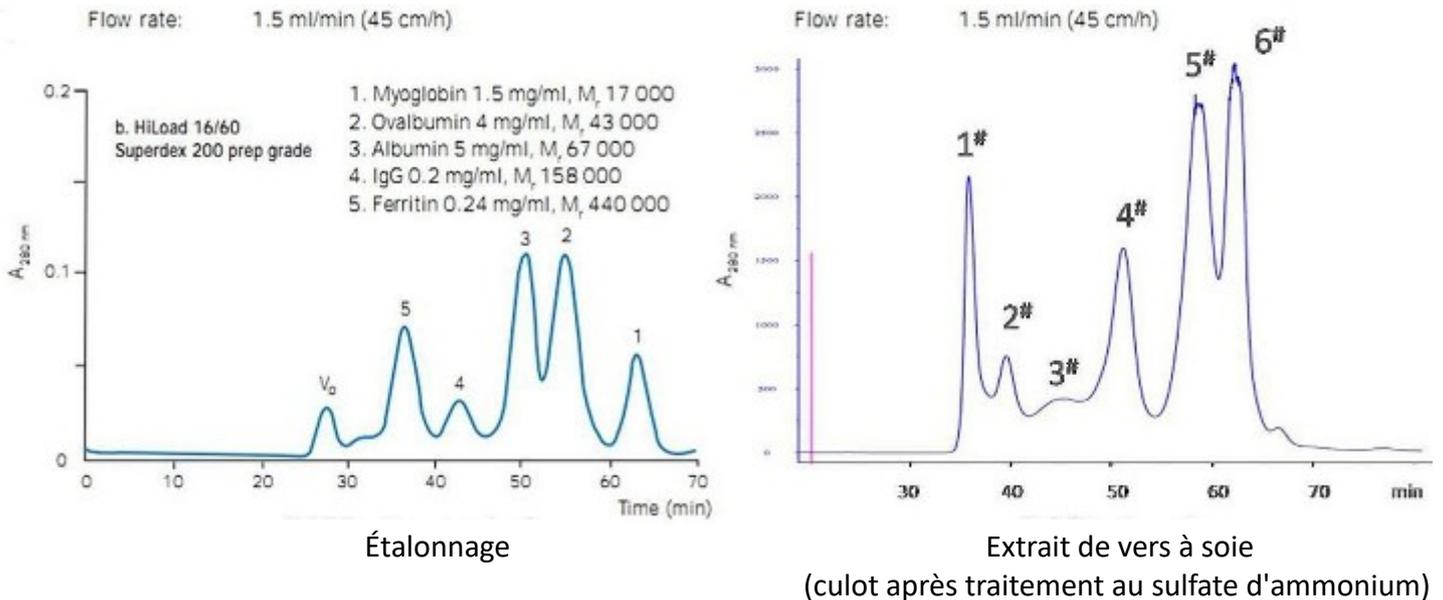
Extraction d'une protéine hGH-like à partir du ver à soie

Pour remplacer l'hormone de croissance humaine (hGH), des recherches sont effectuées pour extraire une protéine de structure similaire à l'hormone de croissance (hGH-like) à partir du ver à soie. La protéine recherchée présente une masse moléculaire d'environ 30 kDa.

Protocole d'extraction :

Les vers sont mixés avec du tampon phosphate puis filtrés sur de la gaze et centrifugés pour éliminer les plus gros débris solides. Les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées au sulfate d'ammonium à 60 %. Après centrifugation le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension en tampon phosphate puis déposé sur une colonne de chromatographie Superdex 200 préalablement étalonnée avec un mélange de protéines témoins.

Résultats :



1. Présenter la technique chromatographique mise en œuvre.
2. Justifier le choix du moyen de détection des protéines utilisé lors de cette analyse.
3. Présenter le principe de la précipitation des protéines au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
4. Indiquer la fraction (1# à 6#) correspondant à la protéine recherchée. Expliquer la démarche.