

TD B3P : CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION ET DÉTERMINATION DE MASSES MOLAIRES

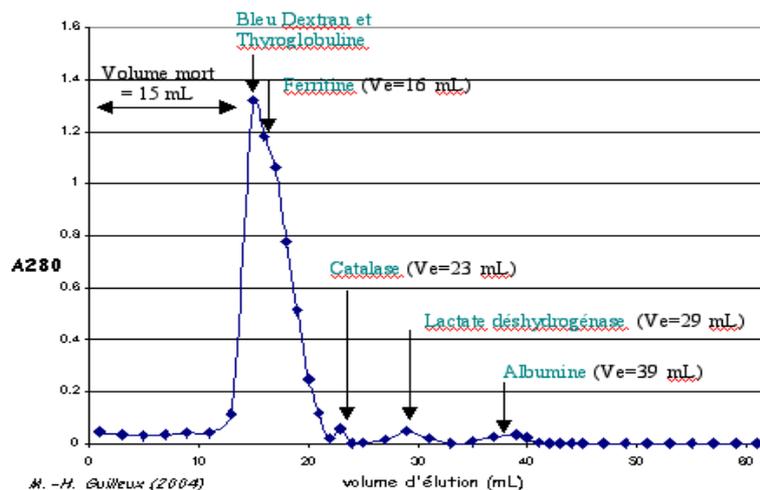
Exercices d'application

Exercice n°1 :

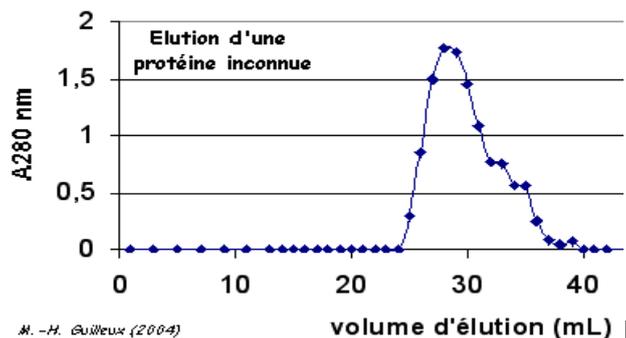
Le gel de chromatographie Superdex G200 (domaine de fractionnement : de 10 kDa à 600 kDa) a été calibré avec les protéines standard suivantes :

- thyroglobuline (669 kDa).
- ferritine (440 kDa).
- catalase (232 kDa).
- lactate déshydrogénase (140 kDa).
- albumine (66 kDa).
- bleu dextran ($2 \cdot 10^3$ kDa).

Le profil d'élution est présenté dans la figure ci-après.



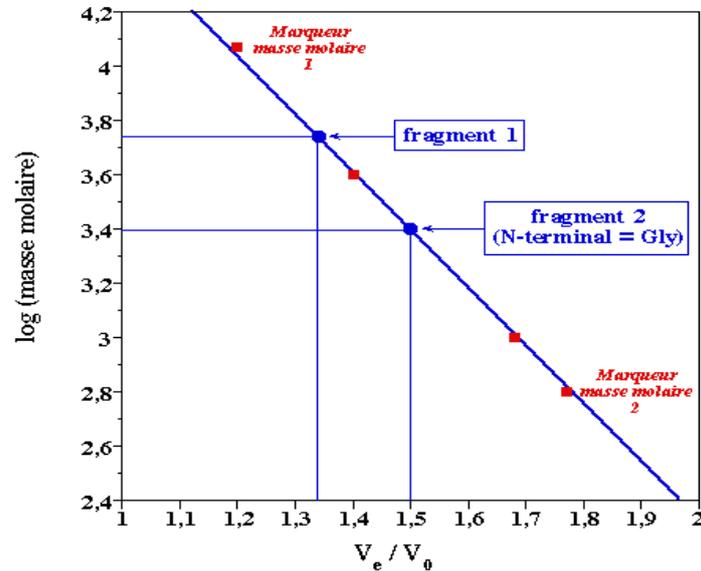
- Q1.** Indiquer le type de chromatographie mis en œuvre.
- Q2.** Expliquer pourquoi la thyroglobuline est éluée avec le bleu dextran.
- Q3.** Indiquer la technique utilisée pour suivre l'élution des protéines. Justifier.
- Q4.** Donner le matériel, les produits et consommables nécessaires pour réaliser cette manipulation.
- Q5.** Estimer la masse molaire d'une protéine inconnue dont le profil d'élution, obtenu dans les mêmes conditions, est présenté dans la figure ci-après.



Exercice n°2 :

Une protéine a été digérée par la protéase V8 qui hydrolyse spécifiquement la liaison peptidique après le résidu d'acide aminé Glu.

Parmi les produits de digestions majeurs, deux ont été détectés après séparation par chromatographie d'exclusion-diffusion.



- Q1.** Donner une estimation du domaine de fractionnement du gel utilisé.
- Q2.** Calculez la masse molaire de chacun des fragments.
- Q3.** La protéine est constituée de 65 acides aminés. Si l'on considère une masse molaire moyenne de 140 Da pour chaque acide aminé, à quelle position dans la séquence primaire se situe le site de digestion ?

Exercice n°3 :

Une colonne de filtration sur gel a un rayon r de 0,80 cm et une longueur l de 20 cm.

- Q1.** Calculer le volume de la colonne.
- Q2.** Le volume de la phase mobile en dehors des particules du gel est de 18,1 mL et le volume total de la phase mobile est de 35,8 mL. Déterminer le coefficient K_{av} pour un soluté élué à 27,4 mL.

Exercice n°4 :

L'hormone lutéinisante (LH) est une hormone produite par les cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. C'est l'une des deux gonadotrophines, avec l'hormone folliculostimulante (FSH).

Le rôle essentiel de la LH est de déclencher l'ovulation qui survient entre 36 et 48 heures après le pic de LH, appelée également décharge ovulante. Mais aussi, elle est en partie responsable de la maturation folliculaire (avec l'hormone FSH) et de la transformation du follicule rompu en corps jaune pendant la phase lutéale du cycle menstruel. Chez l'homme, La LH stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig.

La LH est une glycoprotéine comprenant deux sous-unités (α et β) d'une masse totale de 28 000 daltons. La sous-unité α est commune à plusieurs hormones glycoprotéiques comme la FSH. La sous-unité β est responsable de la spécificité d'activité de l'hormone mais cette activité n'existe que si les deux sous-unités sont associées de manière non-covalente. Dues à ses multiples fonctions, la LH est utilisée comme agent thérapeutique dans certains traitements contre l'infertilité.

Différentes méthodes pour purifier la LH extraite de tissus animaux ont été mises en place mais ces méthodes restent lourdes (7 étapes) et possèdent un mauvais rendement.

Des études récentes ont montré que différentes gonadotropines ont une affinité pour le bleu cibacron, qui était jusqu'à présent utilisé pour purifier des enzymes dépendantes du NAD^+ . Dans cette étude les chercheurs ont développé une méthode pour purifier la LH, à l'aide de bleu cibacron greffé sur un polymère à base de dextrane.

Après extraction de la glande hypophysaire, un mélange ASD est obtenu contenant la LH à purifier, mais aussi de la FSH. À cet extrait, il a été ajouté du tampon phosphate ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{pH } 7,3$), du NaCl ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et 30 mg de bleu dextran (polymère de glucoses identifié à $\lambda = 612 \text{ nm}$) contenant du bleu cibacron. Puis le mélange a été chargé sur une colonne gel filtration (S-200). Le graphique d'éluion obtenu est représenté sur **la figure 1**.

Q1. Souligner les parties qui vous paraissent importantes dans l'énoncé.

Q2. Identifier sur la figure 1, en justifiant, le pic d'intérêt.

Q3. Identifier À quoi peuvent correspondre les autres pics.

La fraction P1 est traitée avec 4 mL de tampon phosphate $\text{pH } 7,3$ contenant du KCl ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pendant 30 minutes à 4°C puis ce mélange est de nouveau purifié par filtration sur gel (colonne S-200), pré-équilibré au préalable par le même tampon. L'éluion de la colonne est faite par le même tampon à une vitesse de $25\text{-}30 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et des fractions de $3,1 \text{ mL}$ sont collectées (**figure 2**).

Q4. Donner l'effet du traitement par KCl $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Q5. Identifier les pics P1 et P2.

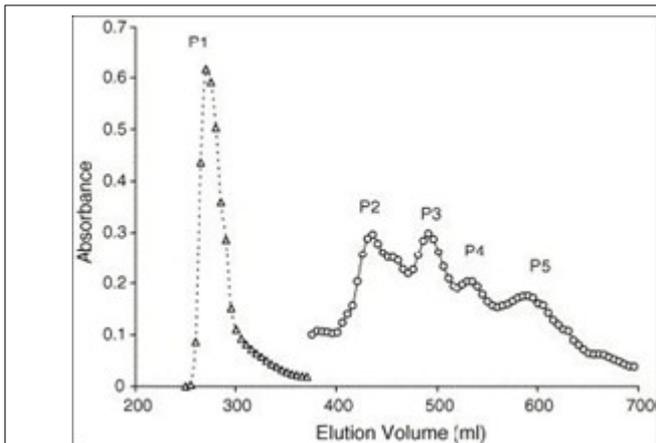


Figure 1 : Chromatogram of dialyzed acid supernatant (ASD) on gel filtration column in presence of fractionated blue dextran. Dotted line shows absorbance at 612 nm (Δ) and solid line shows absorbance at 280 nm (\circ).

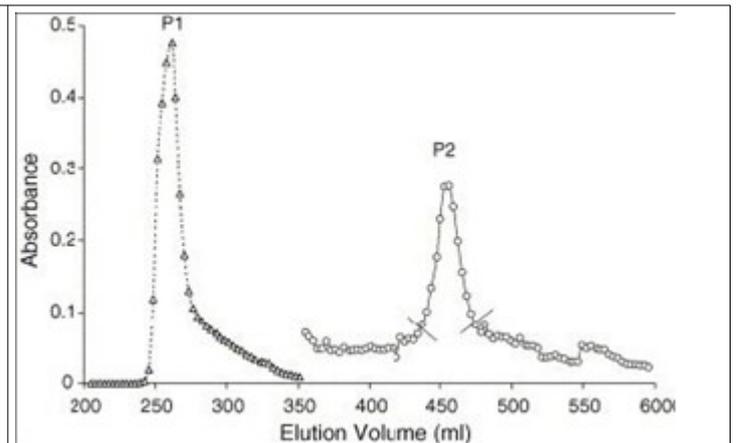


Figure 2 : Chromatogram of material obtained from peak P1 (Fig. 1) on gel filtration column in the presence of $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl in PBS. Dotted line shows absorbance at 612 nm (Δ) and solid line shows absorbance at 280 nm (\circ).

TD B3P : CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION ET DÉTERMINATION DE MASSES MOLAIRES

Exercice d'application (correction)

Exercice n°1 :

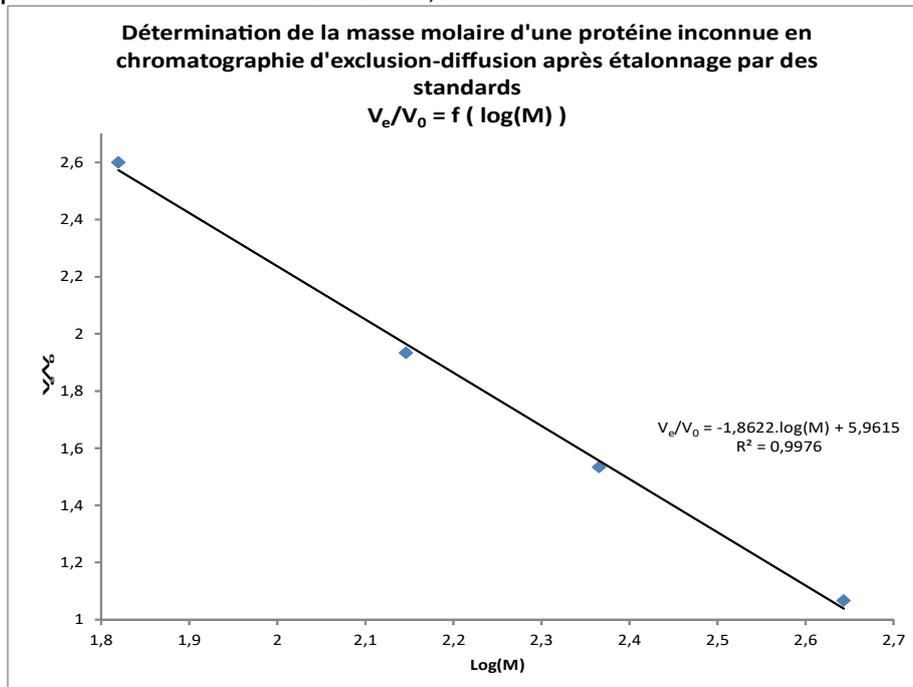
Q1. Chromatographie d'exclusion-diffusion

Q2. $M_{\text{thyroglobuline}}$ (669 kDa) et $M_{\text{bleu dextran}}$ ($2 \cdot 10^3$ kDa) > limite d'exclusion (600 kDa).

Q3. Mesure d'absorbance à $\lambda = 280$ nm car les protéines absorbent à cette longueur d'onde (à cause de la présence d'acides aminés aromatiques : Trp, Tyr).

Q4. Colonne, gel Superdex G200, éluant, tubes de récolte des fractions, cuves, spectrophotomètre, standards.

Q5. V_e/V_0 pour la protéine inconnue = $28/15 = 1,87$



Graphiquement, pour la protéine inconnue, on trouve : $\log(M) = 2,2$; donc $M = 158$ kDa.

Exercice n°2 :

Q1. Domaine de fractionnement de ≈ 500 Da à $\approx 20\,000$ Da

Q2. Pour le fragment 1 : $\log(M) = 3,75$; donc $M_{\text{fragment 1}} = 5\,623$ Da
Pour le fragment 2 : $\log(M) = 3,4$; donc $M_{\text{fragment 2}} = 2\,511$ Da

Q3. $2511/140 = 18$. Le site de digestion se situe après le 18^{ème} acide aminé.

Exercice n°3 :

Q1. $V_{\text{colonne}} = \pi \times \text{rayon}^2 \times \text{hauteur} = \pi \times 0,80^2 \times 20 = 40,2 \text{ cm}^3 = 40,2 \text{ mL}$

Q2. $V_0 = \text{volume mort} = 18,1 \text{ mL}$; $V_t = \text{volume total} = 35,8 \text{ mL}$; $V_e = \text{volume d'élution} = 27,4 \text{ mL}$
 $K_{\text{av}} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$; donc $K_{\text{av}} = (27,4 - 18,1) / (35,8 - 18,1) = 0,53$.

Exercice n°4 :

Q2. Le pic P1 correspond au bleu dextran sur lequel est greffé le bleu de cibacron. Or le bleu cibacron établit des interactions avec les gonadotropines (LH et FSH). Donc ce pic correspond à la fraction dans laquelle on trouve la LH et la FSH.

Q3. Les autres pics correspondent à d'autres protéines présentes dans l'ASD.

Q4. KCl à $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ augmente la force ionique, donc déstabilise les interactions faibles entre le bleu cibacron et les hormones gonadotropiques.

Q5. P1 : bleu cibacron greffé au bleu dextran.

P2 : hormones gonadotropiques (LH et/ou FSH). Il faudrait poursuivre la purification.