

INTERROGATION ORALE

Déterminations comparées de la masse moléculaire d'une protéine par chromatographie d'exclusion et par SDS-PAGE

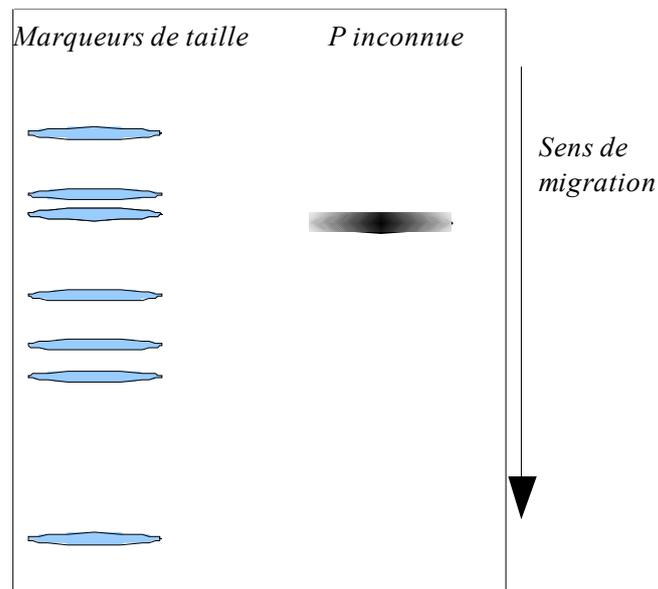
Effectuer cette présentation en vous appuyant sur les éléments ci-dessous.

Document n°1 : Résultat de la chromatographie d'exclusion-diffusion (ou gel filtration) de la protéine P par comparaison à des marqueurs moléculaires

	<i>M</i> (kDa)	<i>V_e</i> (mL)
Bleu dextran	2000	45
Fibrinogène	340	60
P inconnue	?	72
Catalase	230	75
Lactoglobuline	19	132

Document n°2 : Résultat de la détermination de la masse molaire de la protéine P par SDS-PAGE

Masse des marqueurs utilisés: 210 kDa, 150 kDa, 130 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 15 kDa.

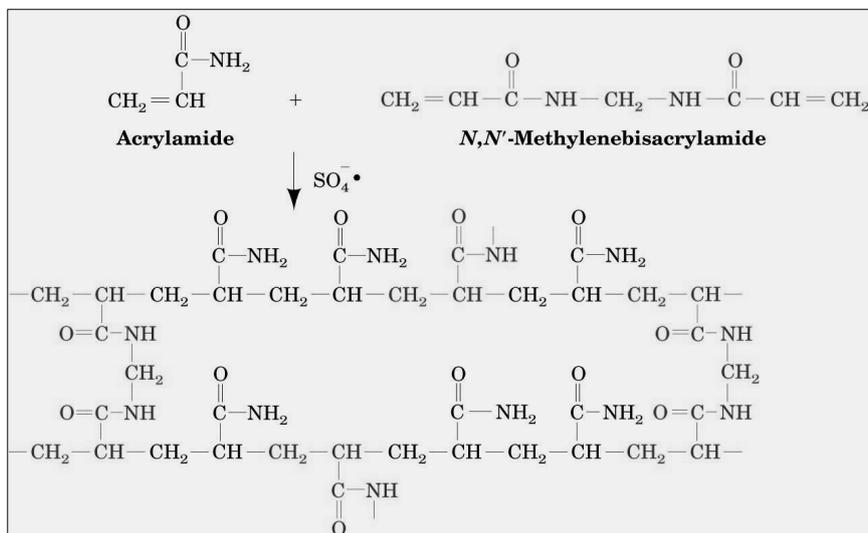


INTERROGATION ORALE

Détermination de la masse molaire d'une protéine par SDS-PAGE

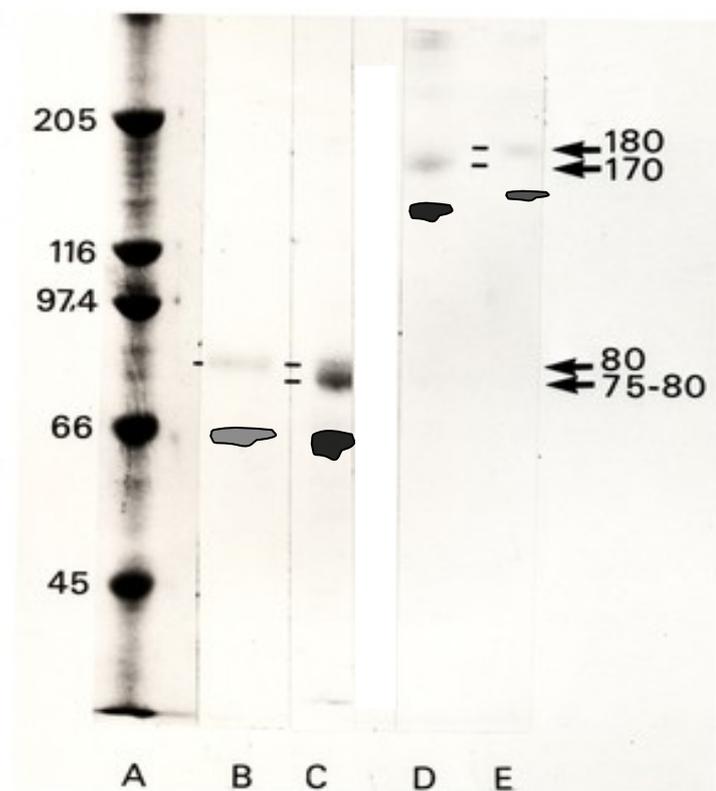
En s'appuyant sur les documents présentés, développer le principe de cette technique.

Document n°1 : Formation d'un gel de polyacrylamide



La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de persulfate (générateur de radicaux libres) et de TEMED (catalyseur)

Document n°2 : Analyse en SDS-PAGE de la dopamine- β -hydroxylase ($\text{D}\beta\text{H}$) purifiée



Les mêmes échantillons ont été soumis à séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide après traitement de 2 minutes à 100°C en présence de SDS.

Les migrations sont réalisées en présence (A, B, C) ou en absence (D, E) de β -mercaptoéthanol.

Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

Piste A : marqueurs de masse moléculaire

Pistes B et E : $\text{D}\beta\text{H}$ (dopamine- β -hydroxylase) purifiées à partir de phéochromocytomes de rat

Piste C et D : $\text{D}\beta\text{H}$ purifiées à partir de phéochromocytomes humains

Les valeurs indiquées sur l'électrophorégramme correspondent à des masses molaires exprimées en kDa.

Donnée complémentaire :

Soumise à une chromatographie d'exclusion sur un gel Sephacryl S-200 dont le domaine de fractionnement est compris entre $5 \cdot 10^3$ et $2,5 \cdot 10^5$ Da, la $\text{D}\beta\text{H}$ humaine est éluée avec le volume mort.

INTERROGATION ORALE

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines

L'annexe ci-dessous présente les résultats de l'électrophorèse bidimensionnelle de la fraction des protéines de la farine de blé extractibles en tampon borate de sodium.

Exposer le principe de la technique et ses performances.

Document n°1 : Protocole

Étape 1 : Extraction des protéines de la farine.

- Peser 50 mg de farine dans un tube à centrifuger de 1,5 mL.
- Ajouter 1 mL de tampon d'extraction au borate de sodium.
- Incuber à 37°C sous agitation pendant au moins 2 heures.
- Centrifuger à température ambiante pendant 15 minutes.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

Cette solution peut être utilisée directement pour une analyse des protéines de la farine.

Étape 2 : Focalisation isoélectrique (IEF).

Étape 3 : Équilibration du gel d'IEF pour l'électrophorèse en présence de SDS.

La bande du gel d'IEF est placée dans le tampon d'équilibration sous agitation lente pendant 10 minutes.

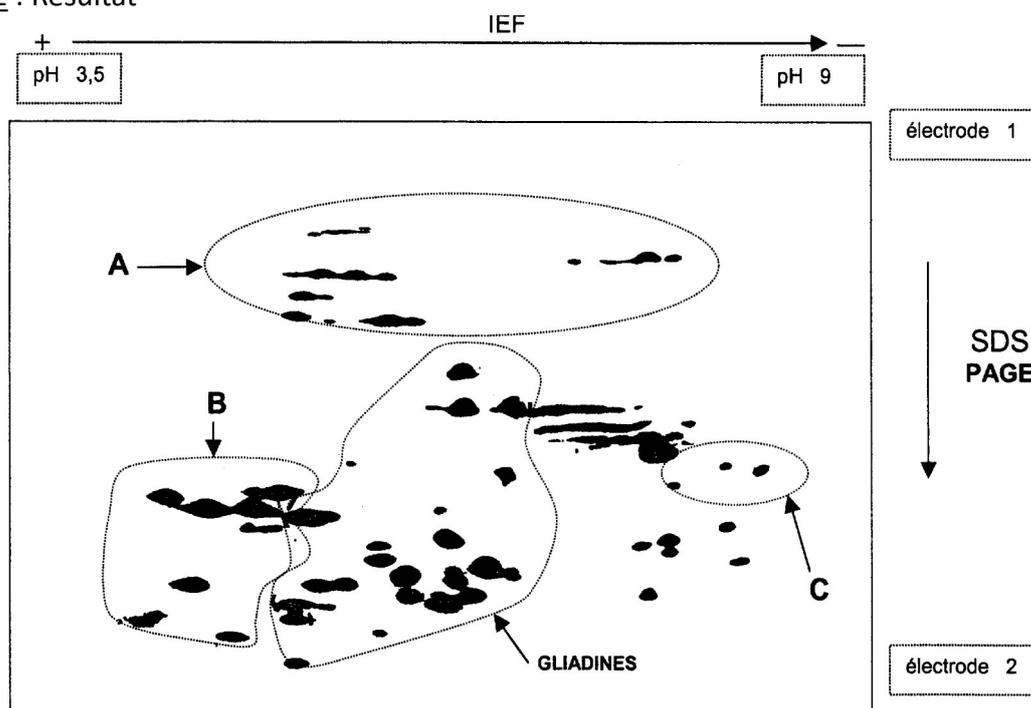
Composition du tampon d'équilibration :

- Urée 6 mol.L⁻¹
- Tris pH 8,8
- SDS 2 %
- Glycérol à 20 %
- Dithiothréitol à 2 %

Étape 4 : Électrophorèse (PAGE) en présence de SDS.

Étape 5 : Révélation du gel par le bleu de Coomassie après précipitation au TCA.

Document n°2 : Résultat



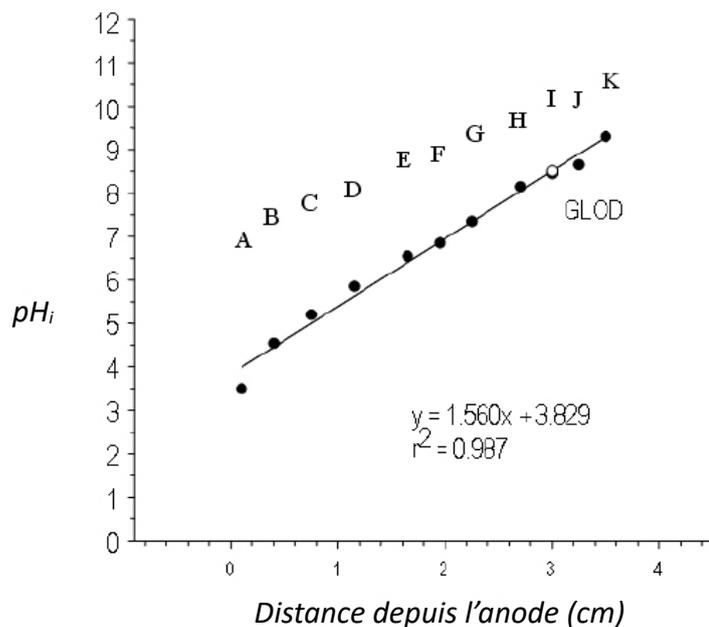
INTERROGATION ORALE

Étude des caractéristiques de la GLOD par électrophorèse

La glutamate oxydase (GLOD) est une enzyme de masse molaire 120 000 Da, qui catalyse spécifiquement la désamination oxydative du glutamate en présence d'eau et de dioxygène avec formation d' α -cétoglutarate, ammoniacque et peroxyde d'hydrogène.

Les documents ci-dessous présentent le résultat d'électrophorèses conduites sur un extrait purifié de GLOD. En exposer le principe et les résultats.

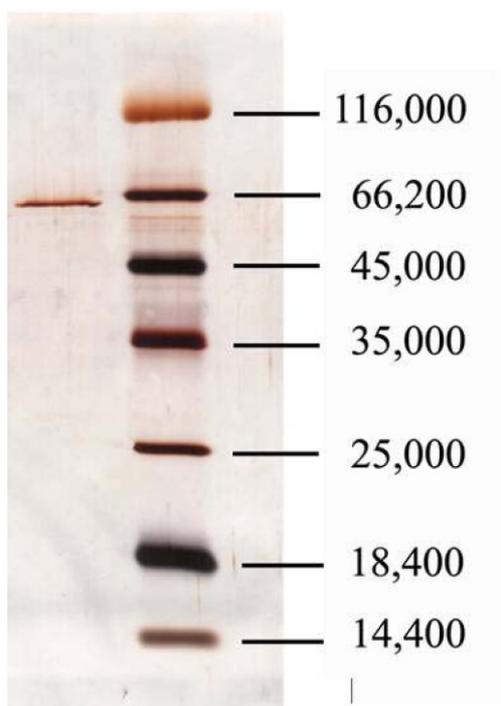
Document n°1 : Détermination du pH_i de la GLOD par focalisation isoélectrique (IEF)



Les marqueurs de pH_i utilisés sont :

- amyloglucosidase (3,5)
- inhibiteur de la trypsine de soja (4,55)
- β -lactoglobuline (5,20)
- anhydrase carbonique B de bœuf (5,85)
- anhydrase carbonique B humaine (6,55)
- myoglobine sous forme acide (6,85)
- myoglobine sous forme basique (7,35)
- lectine de lentille sous forme acide (8,15)
- lectine de lentille non chargée (8,45)
- lectine de lentille sous forme basique (8,65)
- trypsinogène (9,30)

Document n°2 : Résultat d'une SDS-PAGE réalisée sur un extrait purifié de GLOD



Les marqueurs de masse moléculaire utilisés sont :

- lysozyme (14 400 Da)
- β -lactoglobuline (18 400 Da)
- enzyme de restriction *Bsp981* (25 000 Da)
- lactate déshydrogénase (35 000 Da)
- ovalbumine (45 000 Da)
- albumine sérique bovine (66 200 Da)
- β -galactosidase (116 000 Da)

INTERROGATION ORALE

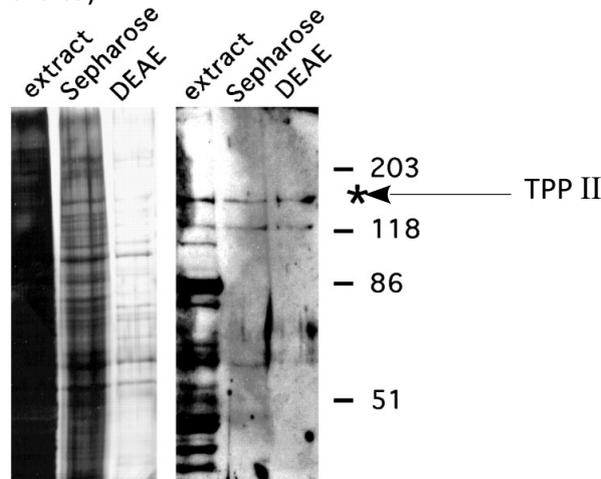
Recherche de protéines par électrophorèse

Détailler le principe des analyses électrophorétiques utilisées dans les documents exposés.

Document n°1 : Purification de protéines

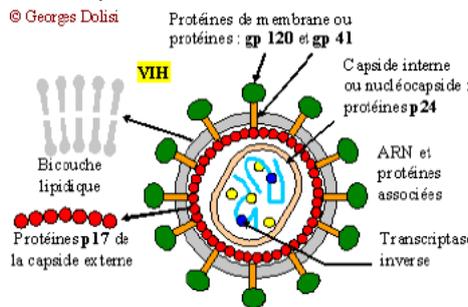
On purifie ici la tripeptidyl peptidase II (TPP II) de *Drosophila melanogaster* par chromatographie d'exclusion sur résine de sépharose et chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-cellulose.

L'extrait brut (« extract ») et les fractions obtenues ayant l'activité peptidase recherchée sont analysées par SDS-PAGE après marquage au nitrate d'argent (*gels de gauche*) suivi d'un western-blot utilisant des anticorps marqués dirigés contre la TPP II (*gels de droite*).



Document n°2 : Sérodiagnostic du virus de l'immunodéficience humaine par western-blot

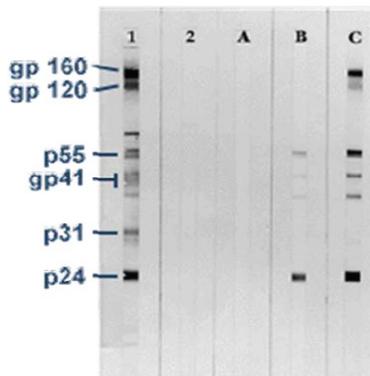
α Schéma simplifié du VIH :



α Protocole :

1. Séparation des protéines protéines virales par SDS-PAGE.
2. Électrotransfert sur bandelette de nitrocellulose.
3. Saturation de la membrane.
4. Incubation avec le sérum du patient.
5. Lavage.
6. Ajout d'anticorps anti-IgG humain couplés à la peroxydase (IgG = immunoglobuline G = classe d'anticorps) permettant de révéler les anticorps humains de classe G.
7. Réaction enzymatique de révélation.

α Résultats :



- ① Bandelette positive
- ② Bandelette négative

INTERROGATION ORALE

Diagnostic d'une maladie génétique : la drépanocytose

Après avoir expliqué la différence de charge existant entre une hémoglobine normale et une hémoglobine drépanocytaire, vous présenterez le principe des différentes méthodes de diagnostic présentées ci-après.

Document n°1 : Présentation de la drépanocytose

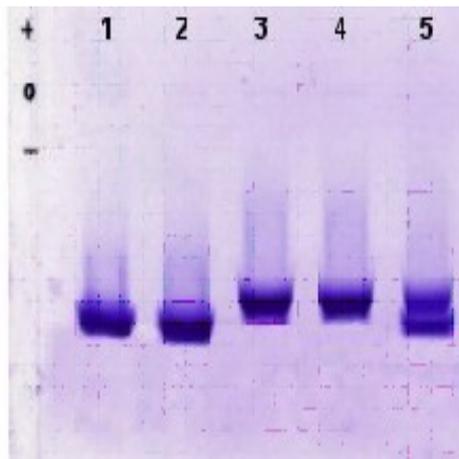
La drépanocytose est une maladie génétique récessive responsable d'une anomalie de globules rouges. Il s'agit d'une maladie provoquant une anémie sévère associée à une forme de globules rouges allongée et en faucille.

Chez les individus sains, les globules rouges contiennent une hémoglobine dite HbA.

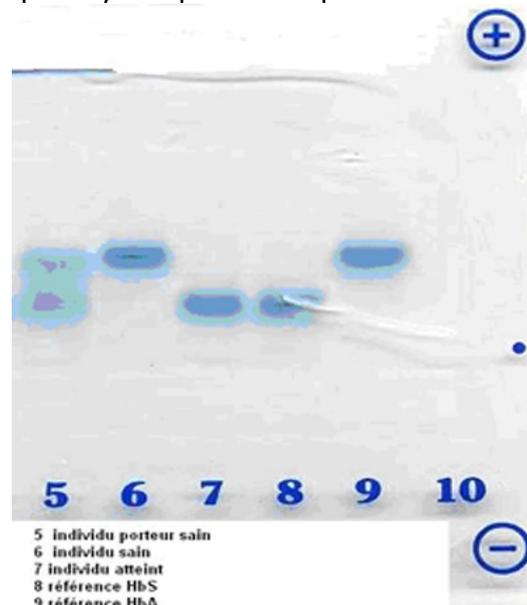
Chez les personnes drépanocytaires, les médecins découvrent la présence d'hémoglobine anormale, dite HbS, hémoglobine fragile dont la durée de vie est de seulement 15 jours (3 mois pour les globules rouges normaux). Cette fragilité entraîne la destruction prématurée des globules rouges et peut provoquer une anémie chez le patient.

Dans l'HbS, le remplacement de l'acide glutamique en position 6 de la chaîne de β -globine par une valine élève le point isoélectrique de l'Hb de 6,95 à 7,25.

Document n°2 : Diagnostic de la drépanocytose par focalisation isoélectrique



Document n°3 : Diagnostic de la drépanocytose par électrophorèse sur acétate de cellulose à *pH* alcalin



INTERROGATION ORALE

Estimation de la taille et de la structure d'une lectine par chromatographie d'exclusion-diffusion et par SDS-PAGE

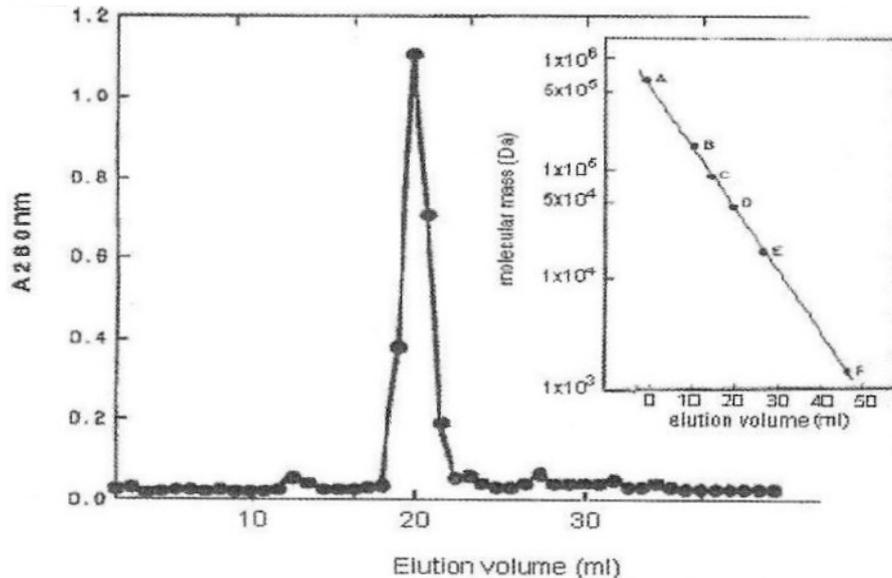
Les lectines sont des protéines qui ont la propriété de se lier à des glucides. Leur utilisation dans les biotechnologies est croissante, comme par exemple dans le cas de biocapteurs de glucose pour le suivi de la glycémie chez des sujets diabétiques.

Une lectine, nommée lectine A, a été extraite et purifiée à partir d'une plante.

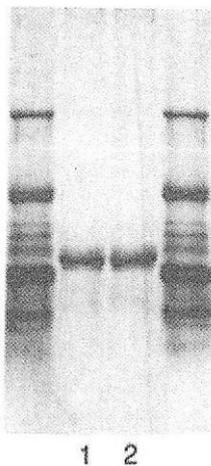
Après avoir présenté le principe de la chromatographie d'exclusion-diffusion et de la SDS-PAGE, expliquer les informations que ces analyses permettent d'obtenir sur la taille et la structure de la lectine A.

Document n°1 : Gel filtration of lectin A on Sephacryl S200

La colonne (1,5 x 120 cm) a été chargée avec 2 mg de la lectine A purifiée et éluée avec 0,05 mol·L⁻¹ de tampon PBS (pH 6,8). Les étalons de masse moléculaire sont la thyroglobuline (670 kDa) (A) ; la gamma-globuline (158 kDa) (B) ; la sérualbumine bovine (66,2 kDa) (C) ; l'ovalbumine (45 kDa) (D) ; la myoglobine (17 kDa) (E) ; et la vitamine B12 (F). Des fractions de 1 mL ont été recueillies, et les protéines ont été analysées par mesures d'absorbance à $\lambda = 280 \text{ nm}$.



Document n°2 : SDS-PAGE de la lectine A purifiée



- pistes de droite et de gauche : marqueurs de taille anhydrase carbonique (31 kDa), inhibiteur de la trypsine (21,5 kDa), myoglobine (16,9 kDa), lysozyme (14,4 kDa), myoglobine clivée par le CNBr (8,1 - 6,2 kDa)
- Piste 1 : lectine A purifiée, en absence de β -mercaptoéthanol
- Piste 2 : lectine A purifiée, en présence de β -mercaptoéthanol

INTERROGATION ORALE

Analyse d'une protéine par électrophorèse SDS-PAGE

Après avoir présenté le principe de la SDS-PAGE, expliquer les informations qu'elle permet d'obtenir pour la protéine A.

Document n°1 : Étude de la protéine A

- La protéine A est tout d'abord traitée par du β -mercaptoéthanol (β -ME) puis soumise à une électrophorèse monodimensionnelle en présence de Sodium-Dodécyl-Sulfate (SDS). Le résultat de l'électrophorèse est schématisé au document 2A.
- La protéine A est également traitée (de manière indépendante à l'expérience précédente) par une enzyme E1. Le produit de la digestion enzymatique est également analysé par électrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS. Cette analyse est effectuée dans deux conditions : soit le produit de la digestion enzymatique est analysé directement, soit ce produit est traité par du β -ME avant d'être analysé. Les résultats de cette expérience sont schématisés au document 2B.

Document n°2 : Résultats d'électrophorèses pour la protéine A

