

INTERROGATION ORALE

Purification de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger*

L'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* est particulièrement intéressante en biotechnologies.

Des souches recombinantes d'*Aspergillus niger* permettent une production facilitée.

Avant purification, un extrait soluble brut de l'enzyme est préparé en plusieurs étapes à partir d'une culture d'*Aspergillus niger* en bioréacteur. La dernière étape est une ultrafiltration.

À partir des documents ci-dessous, présenter la démarche employée pour la purification et le suivi de purification de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger*.

Document n°1 : Étapes de la purification de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger*

Etape 1 : chromatographie échangeuse d'ions, DEAE-Sépharose *

380 mL d'extrait soluble brut sont déposés sur une colonne de DEAE Sépharose équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,1 additionné de 1 mM d'EDTA, 1mmol/L de cystéine et de 0,5 mmol/L de PMSF appelé tampon A. Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 0,35 mol/L de KCl dans le tampon A. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées par un système d'ultrafiltration jusqu'à un volume de 25 mL. Après avoir ajouté le sulfate d'ammonium à 60% de saturation et agité, la solution est centrifugée à 15000 trs/min pendant 30 min. Le culot est resuspendu dans 5 mL de tampon A contenant 0,5 mol/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Etape 2 : chromatographie d'interaction hydrophobe, Phényl-Sépharose

Les 5 mL de concentrat précédemment obtenu sont déposés sur la colonne de Phényl-Sépharose équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,1 additionné de 0,5 mol/L de sulfate d'ammonium, les protéines retenues sont éluées avec le tampon A. L'enzyme est éluée dans les fractions 1 à 20, rassemblées et concentrées par ultrafiltration. Ce pool est dialysé et le volume obtenu de 11,5 mL qui constitue la charge de la colonne mono Q.

Etape 3 : chromatographie échangeuse d'ions, Mono-Q *

Le dialysat est déposé sur la colonne mono Q équilibrée avec du tampon A. Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 0,25 mol/L de KCl dans le tampon A. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées jusqu'au volume de 200 μL .

Etape 4 : chromatographie d'exclusion ou gel filtration, Supérose 12

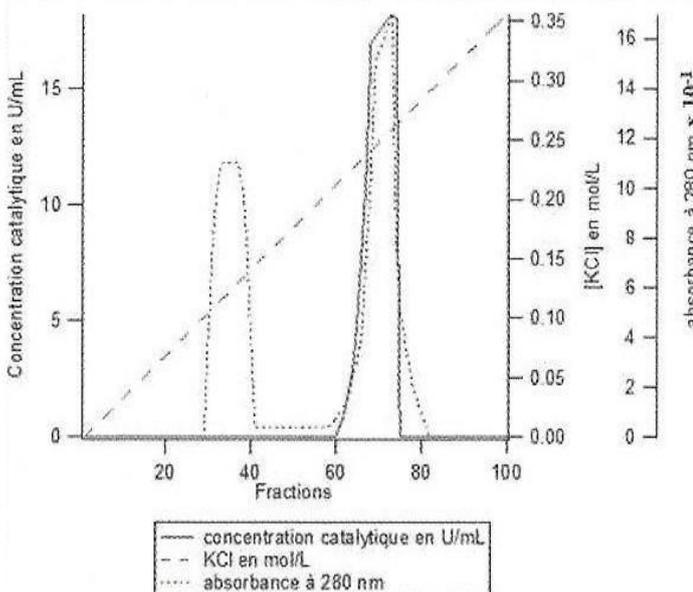
Le concentrat (200 μL) est injecté dans la colonne de Supérose 12 équilibrée avec du tampon A. Les fractions actives sont rassemblées puis conservées dans 20% de glycérol à -80°C . Une fraction aliquote est prélevée pour faire la caractérisation de l'enzyme.

*Remarque :

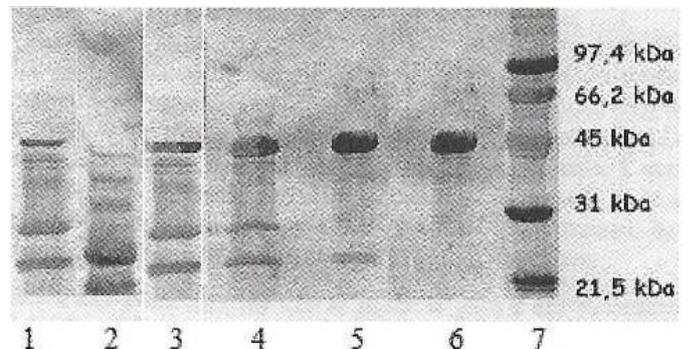
DEAE ou Diéthylaminoéthyl : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$

Mono-Q ou ammonium quaternaire : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$

Document n°2 : Suivi de l'éluion après injection de l'extrait brut sur DEAE-Sépharose



Document n°3 : Contrôle de purification par SDS-PAGE



Préparation de l'extrait brut soluble :

1 : Rétentat obtenu après ultrafiltration ou extrait brut soluble

2 : Perméat obtenu après ultrafiltration

Purification de l'époxyde hydrolase d'*A.niger* :

3 : Après étape 1

4 : Après étape 2

5 : Après étape 3

6 : Après étape 4

7 : Marqueur de taille

INTERROGATION ORALE

Purification des glycoprotéines à partir d'un plasma humain

En s'appuyant sur les documents ci-dessous, présenter le principe des techniques employées pour purifier les glycoprotéines (protéines avec un/des résidus glucidique) à partir d'un plasma humain, et analyser les résultats.

Document n°1 : Caractéristiques de la colonne *HiTrap ConA 4B*

La colonne ConA est constituée d'un polymère glucidique, le sépharose, sur lequel ont été greffées des molécules de concanavoline A. La concanavoline A est une protéine tétramérique capable de se lier à des molécules contenant des résidus de mannose ou de glucose (glucides).

Pour maintenir les caractéristiques de liaison de la concanavoline A, la présence d'ions Mn^{2+} et Ca^{2+} est essentielle.

Document n°2 : Purification des glycoprotéines à partir d'un plasma humain

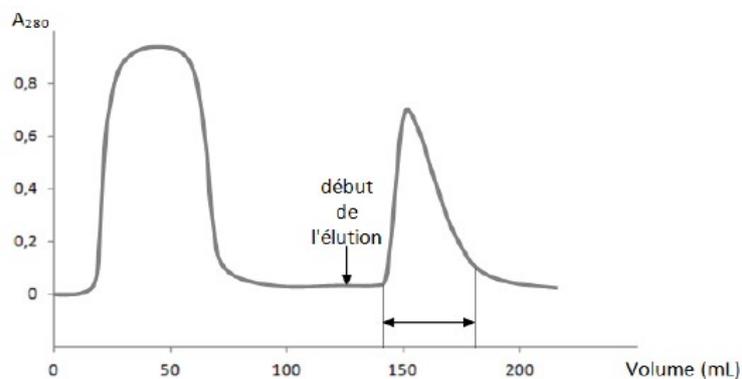
– Chromatogramme :

Colonne : *HiTrap ConA 4B*

Échantillon : 0,5 mL de plasma dilué au 1/10^{ème}.

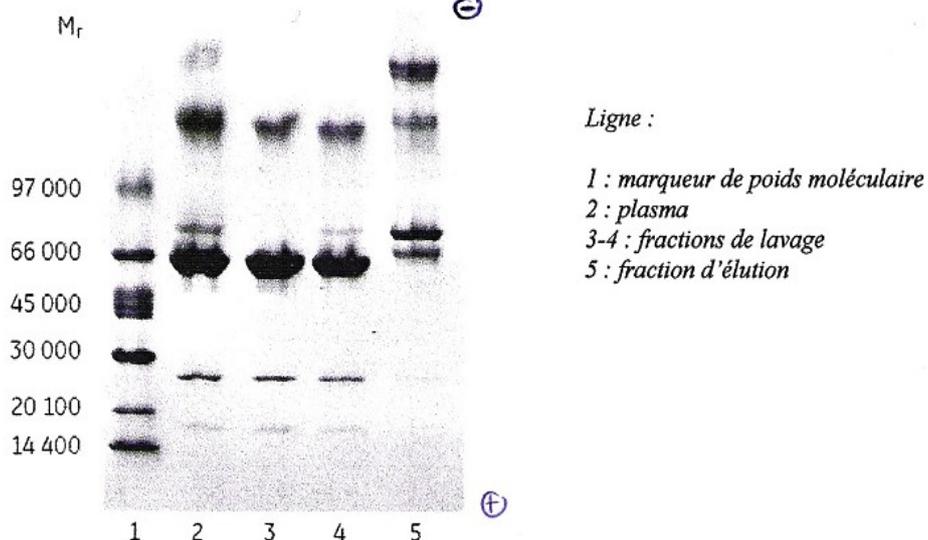
Tampon de liaison : Tris à 20 mmol·L⁻¹, NaCl à 500 mmol·L⁻¹, MnCl₂ à 1 mmol·L⁻¹, pH 7,4.

Tampon d'éluion : Tris à 20 mmol·L⁻¹, NaCl à 500 mmol·L⁻¹, méthyl-glucoside (analogue glucidique) à 300 mmol·L⁻¹, pH 7,4.



– Contrôle par SDS-PAGE :

Le gel est coloré au bleu de Coomassie.



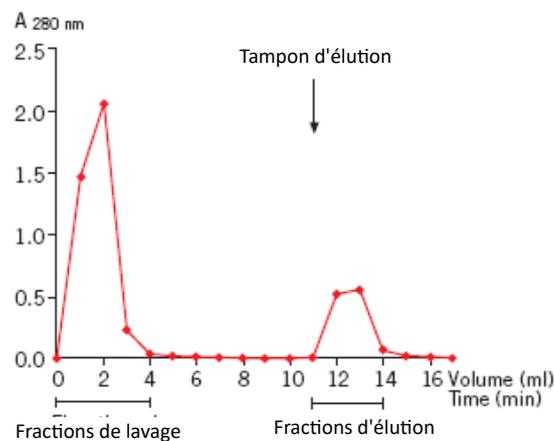
INTERROGATION ORALE

Purification d'une immunoglobuline

L'annexe ci-dessous fait référence à la purification d'une protéine, l'immunoglobuline IgG2b, et à son contrôle. En exposer les principes en s'appuyant sur l'analyse des éléments de cette annexe.

Document n°1 : Purification des IgG2b de souris sur colonne *HiTrap rProtein A FF*

- Échantillon: 1 mL de liquide péritonéal de souris filtré.
- Colonne : *HiTrap rProtein A FF*.
- Tampon de lavage : tampon phosphate $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ - *pH* 7.
- Tampon d'élution : tampon citrate de sodium $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ - *pH* 3.
- Débit : $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



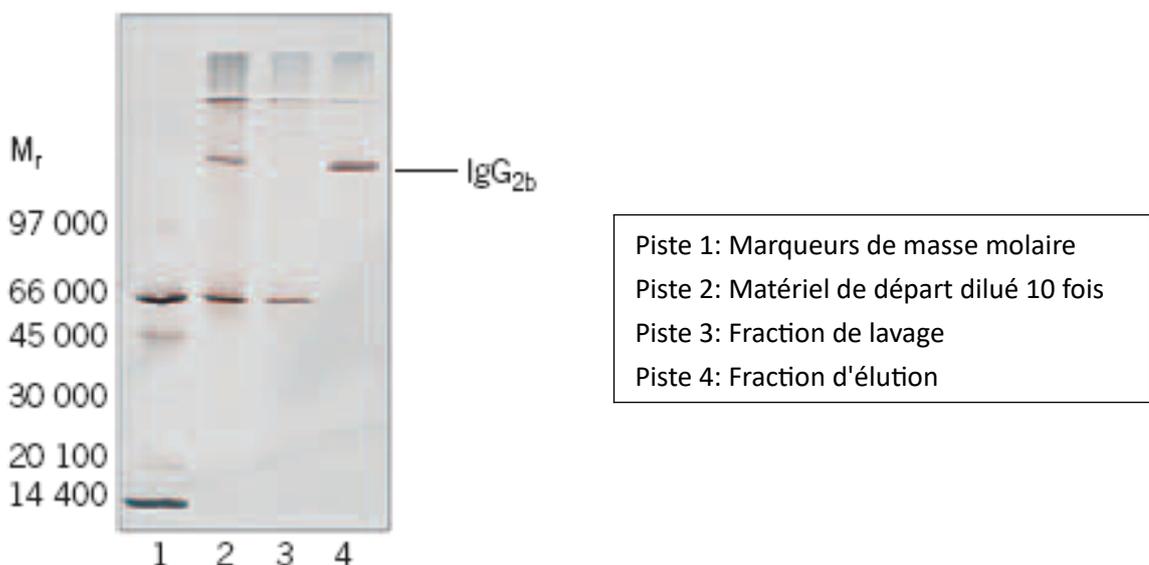
Document n°2 : Caractéristiques de la colonne *HiTrap rProtein A FF*

Composition	Capacité de liaison	Débit maximal
Résine greffée avec la protéine A	250 mg d'IgG/colonne	$20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Remarque : la protéine A établit des interactions biospécifiques avec le fragment constant F_c des IgG.

Document n°3 : Contrôle de la purification par SDS-PAGE

Le gel de SDS-PAGE est révélé au nitrate d'argent.



INTERROGATION ORALE

Extraction et purification des gliadines

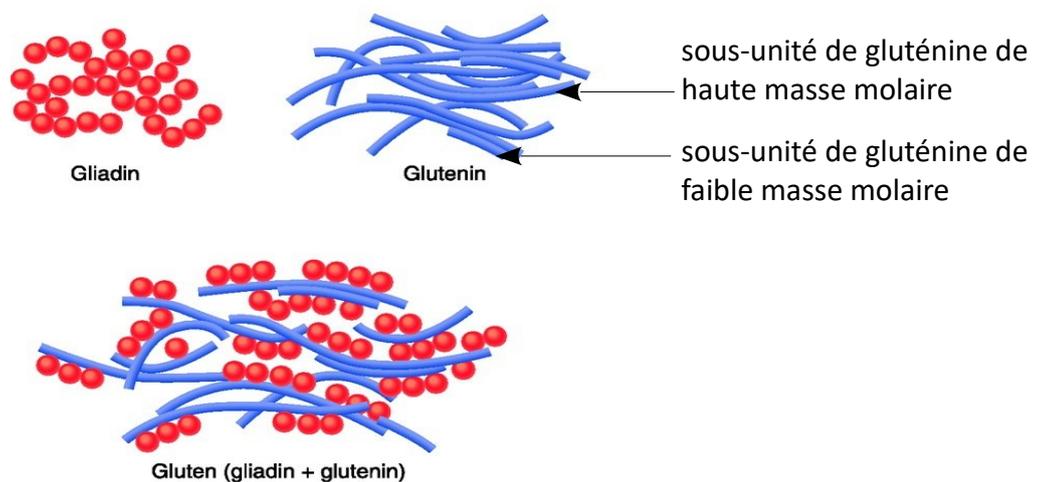
À l'aide des documents fournis, exposer le principe des méthodes mises en œuvre dans la stratégie d'extraction, de purification et de contrôle de purification des gliadines du gluten de la farine de blé.

Document n°1 : Le gluten

Le gluten de blé est un produit alimentaire obtenu après lixiviation de la farine. Il contient les protéines de réserve de la farine et des traces de lipides et d'amidon.

La réserve protéique du gluten est constituée de deux types de structures protéiques :

- des protéines monomériques : les gliadines α , β , γ (gamma), et ω (oméga).
- de gluténines, rassemblant des sous-unités de gluténines de hautes masses molaires et des sous-unités de gluténines de faibles masses molaires.



Selon la définition d'Osborne, les gliadines représentent la fraction protéique du gluten soluble dans l'éthanol à 70 % (V/V).

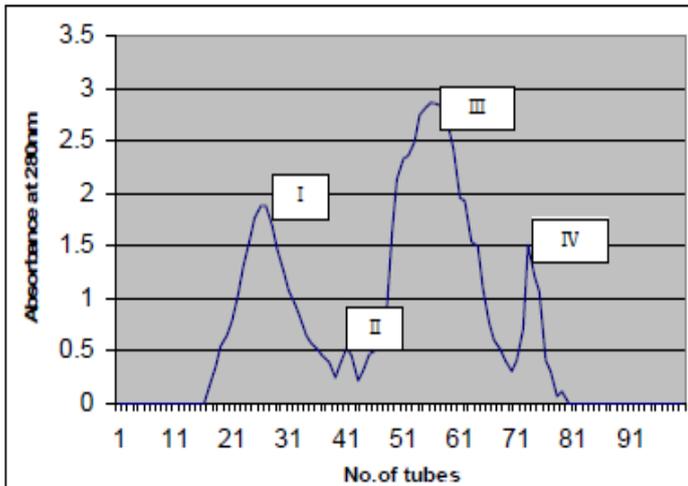
Certains individus présentent une allergie aux gliadines ; celle-ci se manifeste dès l'enfance et se caractérise par une diarrhée chronique suivie de retards statural et osseux ainsi que de troubles psychiques (maladie coeliaque). En l'absence de régime spécifique, la mort survient rapidement.

Document n°2 : Extraction des gliadines à partir de farine de blé

- 1) Peser exactement environ 1 g de farine et introduire dans un tube à centrifuger.
- 2) Mettre en suspension la totalité de l'échantillon pesé dans 10 mL de solution aqueuse d'éthanol à 40 % (V/V).
- 3) Agiter 4 fois 30 secondes au vortex puis centrifuger 10 minutes à 3 000 g.
- 4) Récupérer le surnageant et doser les protéines selon la méthode du biuret.
- 5) Prélever 0,5 mL de surnageant et transférer dans un microtube à centrifuger.
- 6) Ajouter le volume d'éthanol à 95 % (V/V) nécessaire pour amener la concentration à 70 % (V/V) en éthanol.
- 7) Laisser 15 minutes à température ambiante.
- 8) Centrifuger 5 minutes en microcentrifugeuse.
- 9) Récupérer le surnageant et doser les protéines en utilisant la méthode du biuret.

Document n°3 : Purification des gliadines du gluten de la farine de blé

- 1^{ère} étape : Chromatographie



- Résine : Séphadex G100
- Domaine de fractionnement de la résine : 4-150 kDa.
- Débit : 0,3 mL·min⁻¹.
- Éluant : Acide acétique à 0,1 N + urée à 3 mol·L⁻¹.
- Pic I : bleu dextran.
- Pics II et III : fractions contenant les gliadines du gluten de la farine de blé.

- 2^{ème} étape : Dialyse des fractions contenant les gliadines

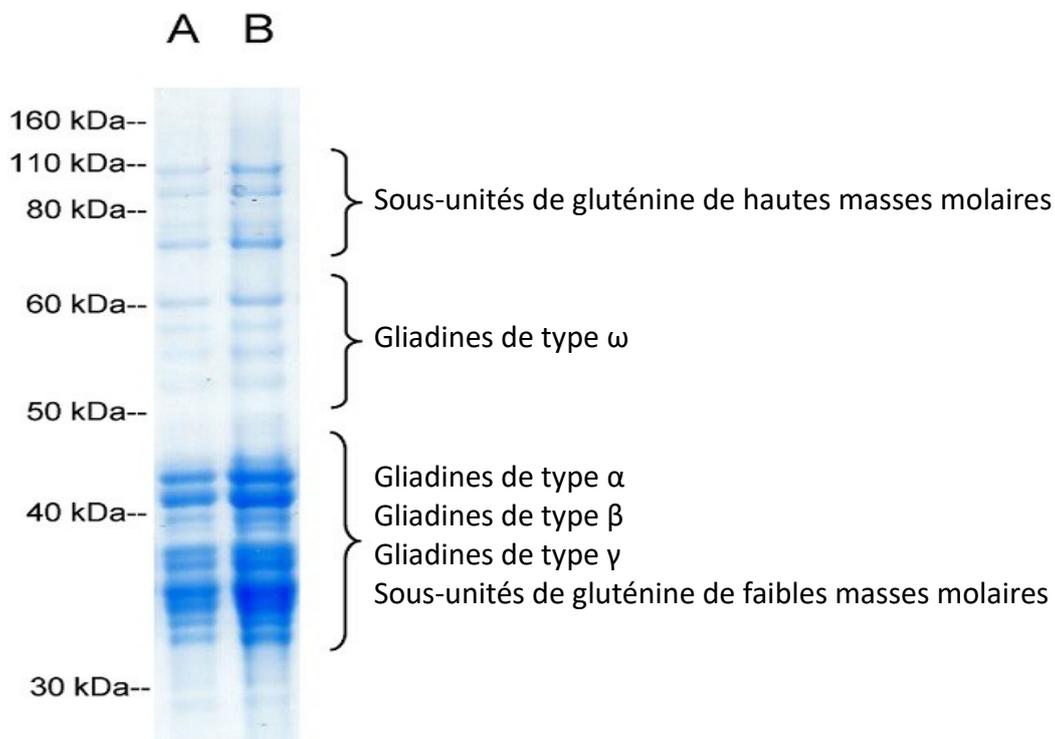
Les fractions correspondant aux tubes 38 à 72 sont regroupées puis dialysées contre de l'eau distillée pendant 24 heures.

La membrane de dialyse utilisée a un seuil de rétention (ou seuil de coupure) de 14 kDa (les molécules ayant une masse molaire supérieure à 14 kDa ne diffusent pas à travers les pores de la membrane).

Données : - $M_{urée} = 60,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

- $M_{acide\ acétique} = 60,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

- 3^{ème} étape : Contrôle de purification des fractions purifiées par SDS-PAGE



- Piste A : Marqueur de masses molaires.
- Piste B : Fraction purifiée.
- Révélation : bleu de Coomassie.

INTERROGATION ORALE

Purification et caractérisation de la chitinase de *Streptomyces*

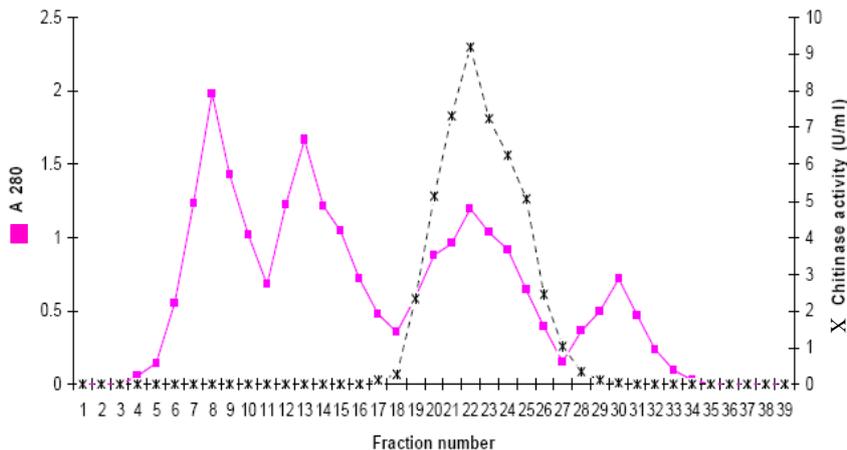
En s'appuyant sur les annexes ci-dessous, expliquer la purification la chitinase, et la détermination de sa masse molaire.

Document n°1 : Purification de la chitinase

- 1) Une suspension de *Streptomyces* (moisissure) est filtrée sur une membrane millipore (diamètre des pores : 0,45 μm).
- 2) Le filtrat est soumis à une chromatographie sur résine Séphadex G100 dont le domaine de fractionnement est 4-100 kDa.

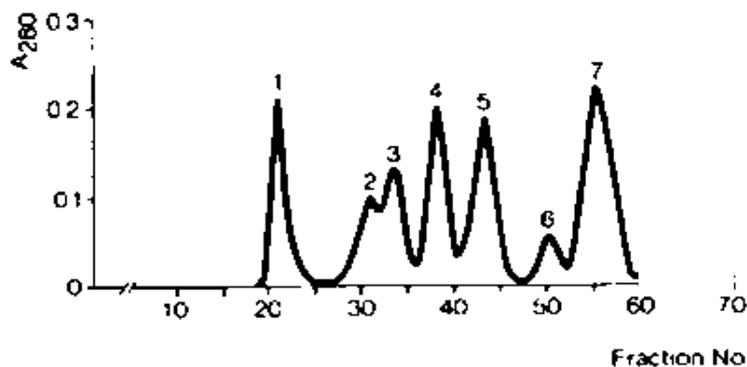
Les fractions récoltées ont un volume de 2 mL.

La colonne a été équilibrée en tampon phosphate pH 7.



Document n°2 : Détermination de la masse molaire de la chitinase

L'étalonnage de la colonne Séphadex G100 avec des marqueurs de poids moléculaire donne le résultat suivant :



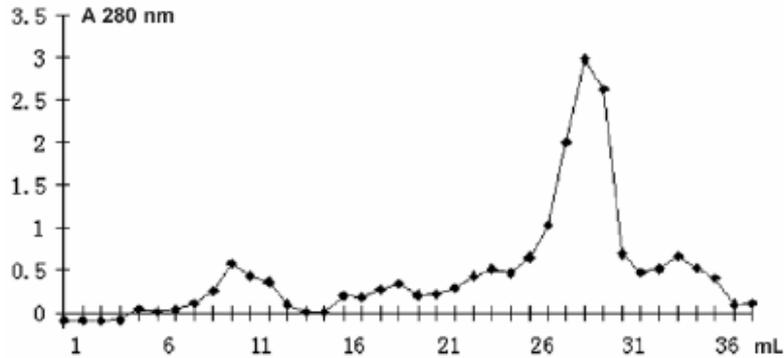
- 1 : Bleu dextran
- 2 : Sérum Albumine Bovine
- 3 : Chaîne lourde d'immunoglobuline
- 4 : Chymotrypsine
- 5 : Cytochrome C
- 6 : Insuline
- 7 : Chaîne B de l'insuline

INTERROGATION ORALE

Suivi, révélation et quantification non spécifique des protéines

Développer ces notions en incluant dans la présentation les exemples fournis ci-dessous.

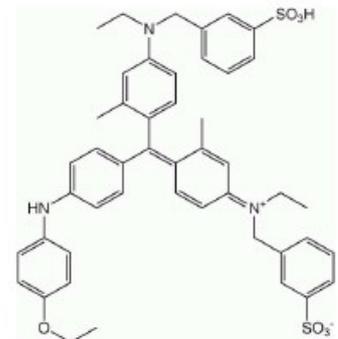
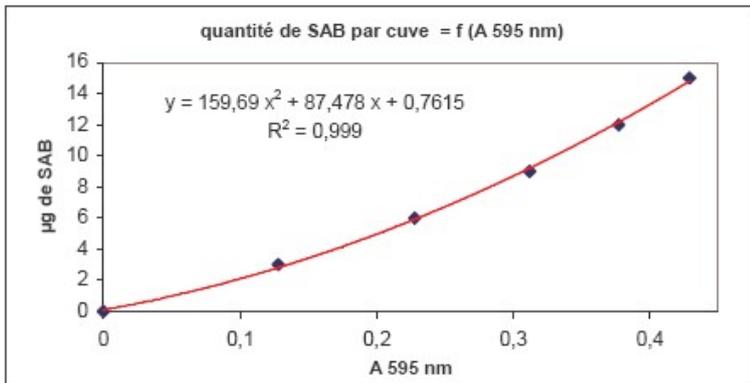
Document n°1 : Suivi d'une chromatographie d'exclusion-diffusion réalisée sur un mélange de protéines



Document n°2 : Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD

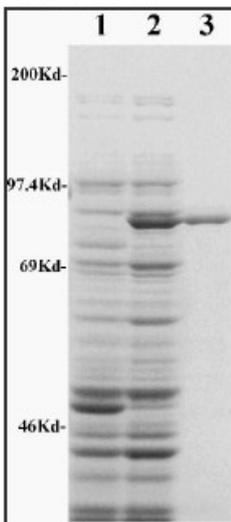
Gamme étalon de Sérum Albumine Bovine (SAB) :

µg de SAB / cuve	0	3	6	9	12	15
A 595 nm	0	0,128	0,228	0,312	0,377	0,429



Bleu de Coomassie

Document n°3 : Gel de SDS- PAGE révélé au bleu de Coomassie



Puits :

- 1- sonicat de cellules d'*E.coli* n'exprimant pas le gène de la Taq DNA polymérase
- 2- sonicat de cellules d'*E.coli* exprimant le gène de la Taq DNA polymérase
- 3- extrait purifié de Taq DNA polymérase produite

Remarque : le sonicat est la fraction obtenue après sonication.

INTERROGATION ORALE

Purification du lysozyme

L'annexe ci-dessous fait référence à la purification du lysozyme de blanc d'œuf par chromatographie et au suivi de cette purification. En exposer les principes en vous appuyant sur des éléments choisis dans cette annexe.

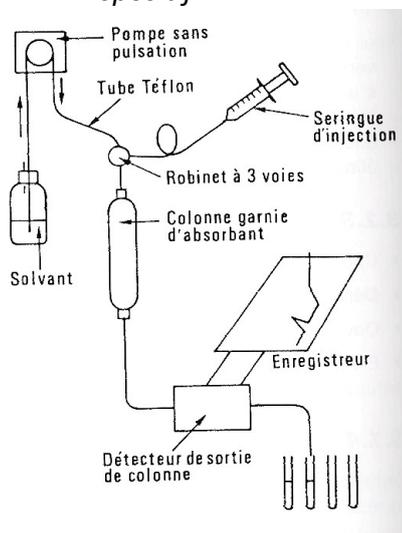
Document n°1 : Présentation du lysozyme

Le lysozyme (EC 3.2.1.17) est une enzyme catalysant l'hydrolyse des liaisons β_{1-4} entre les résidus d'acide N-acétylmuramique et de N-acétyl-glucosamine présents dans le peptidoglycane des parois bactériennes. Il est également présent dans le blanc d'œuf où il représente 7 à 8 % des protéines.

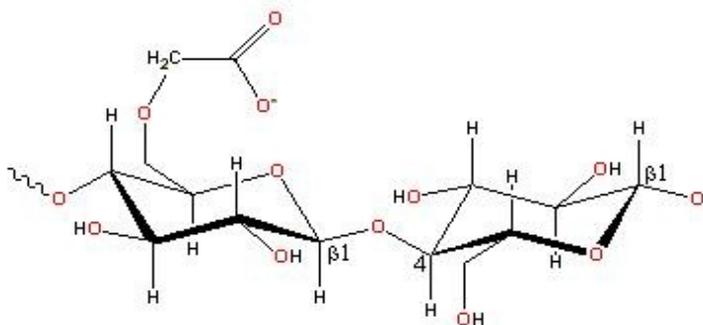
Il se caractérise par un pH_i 10,5 nettement supérieur à celui des autres protéines du blanc d'œuf.

Document n°2 : Système chromatographique utilisé

α Dispositif :



α Résine utilisée : Carboxy-méthyl-cellulose (CMC)



α Tampons utilisés :

Tampon glycine - NaOH, pH 10

Pour 1 L : glycine $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($7,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) : 617 mL
NaOH $0,1 \text{ mol/L}$: 383 mL

Vérifier le pH et ajuster si besoin à 10. Stocker à 4°C .

Tampon glycine - NaOH, pH 10 + NaCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Pour 1 L : NaCl pur sec : 29,25 g

Tampon glycine - NaOH pH 10 : qsp 1L

Document n°3 : Mesure de l'activité du lysozyme

α Protocole :

Introduire dans une macrocuve de spectrophotomètre à température ambiante :

- 2,9 mL de suspension de *Micrococcus lysodeikticus*.
- 0,1 mL de fraction à tester, éventuellement diluée en tampon phosphate pH 6,24.
- Boucher avec du parafilm et homogénéiser rapidement par retournement.
- Enregistrer la diminution de l'atténuation D_{450} à $\lambda = 450 \text{ nm}$ pendant 1 minute.

α Résultats :

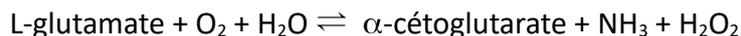
	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)
Extrait brut	9000	600
Fraction purifiée	6000	7500

Une unité lysozyme (1 U) est la quantité de lysozyme nécessaire pour une diminution de 0,001 unité d'atténuation à $\lambda = 450 \text{ nm}$ par minute dans les conditions opératoires définies.

INTERROGATION ORALE

Purification de la L-Glutamate oxydase

La L-glutamate oxydase (GLOD) est une enzyme qui catalyse spécifiquement la désamination oxydative du glutamate en présence d'eau et de dioxygène avec formation d' α -cétoglutarate, d'ammoniaque et de peroxyde d'hydrogène :



L'annexe ci-dessous présente une démarche de purification de la GLOD.

Exposer le principe de la purification réalisée et de son suivi.

Document n°1 : Purification de la GLOD de *Streptomyces sp.*

- La précipitation au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est utilisée pour concentrer l'extrait brut. La concentration en sulfate d'ammonium est portée à 80 % de saturation. Le précipité est récupéré par centrifugation. Le culot est redissous en tampon phosphate *pH* 6 puis la solution obtenue est dialysée contre ce même tampon.
- La solution est déposée sur une résine échangeuse de cations équilibrée en tampon phosphate *pH* 6. Après lavage, l'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl 0-3 mol·L⁻¹. Les fractions d'élution présentant une activité GLOD sont réunies, concentrées et dessalées.
- La solution obtenue est déposée sur une colonne échangeuse d'anions. Celle-ci est lavée avec un tampon Tris *pH* 8. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl 0-1 mol·L⁻¹. Les fractions de lavage présentant une activité GLOD sont réunies et constituent l'extrait purifié.

Document n°2 : Résultats de la purification

	Masse de protéines (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U·mg ⁻¹)
Extrait brut	1,203	185,25	0,15
Précipitation au sulfate d'ammonium	376,6	151,03	0,4
Chromatographie échangeuse de cations	10,7	70,23	6,56
Chromatographie échangeuse d'anions	0,72	33,43	46,48

Dosage de la GLOD :

Le milieu réactionnel contient 1 μmol de 4-amino-antipyrine, 17,5 μmol de phénol, 2,5 U de peroxydase de radis, l'échantillon contenant la GLOD, le tout en tampon phosphate *pH* 7,4 dans un volume total de 1,3 mL. Après une préincubation de 2 minutes à 37°C, la réaction est initiée par ajout de 10 μmol de glutamate. L'absorbance à $\lambda = 500 \text{ nm}$ est mesurée après une incubation de 30 minutes à 37°C.

Une unité de GLOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 μmole de H_2O_2 par minute dans les conditions opératoires définies.

Détermination de la masse protéique :

Le dosage protéique utilise la méthode de Bradford.

Le sérum albumine bovine (BSA) est utilisée comme standard.

INTERROGATION ORALE

Extraction et purification de la Taq polymérase

En s'appuyant sur les documents ci-dessous, présenter l'extraction, la purification et le contrôle de purification de l'enzyme thermostable Taq polymérase.

Document n°1 : Protocole d'extraction et de purification de la Taq polymérase

La Taq polymérase a été purifiée à partir d'une culture de cellules d'*Escherichia coli* DH5α possédant le plasmide *pTAQ*. Ce plasmide contient le gène de la Taq polymérase placé sous la dépendance du promoteur de l'opéron lactose. Après croissance jusqu'à une atténuation $D_{600} = 0,3$ et induction par l'IPTG, la culture a été incubée pendant 16 heures à 37°C.

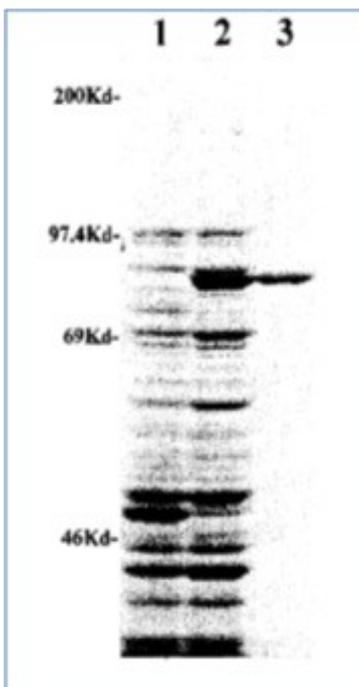
Les cellules sont centrifugées puis remises en suspension dans 3 mL de tampon Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹, pH 7,9, glucose 50 mmol·L⁻¹, EDTA 1mmol·L⁻¹ contenant 4 mg·mL⁻¹ de lysozyme puis incubées 15 minutes à température ambiante.

3 mL de tampon Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹, pH 7,9, KCl 10 mmol·L⁻¹, EDTA 1 mmol·L⁻¹, Tween 20 0,5 %, Nonidet P40 0,5 % ont été ajoutés. Le mélange a été incubé 60 minutes à 75°C en bain marie agité.

Les débris cellulaires et protéines dénaturées sont ensuite éliminés par centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C.

Le surnageant obtenu est mélangé volume à volume avec un tampon de conservation (Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹, pH 8,0, NaCl 100 mmol·L⁻¹, EDTA 1 mmol·L⁻¹, DTT 0,5 mmol·L⁻¹, Triton X-100 1 %) contenant 50 % de glycérol. La solution obtenue est stockée à -20 °C.

Document n°2 : Contrôle de la purification par SDS-PAGE (gel à 12 %)



Piste 1: sonicat de cellules d' *E. coli* n'exprimant pas la Taq polymérase
 Piste 2: sonicat de cellules d' *E. coli* exprimant la Taq polymérase
 Piste 3: solution purifiée de Taq polymérase

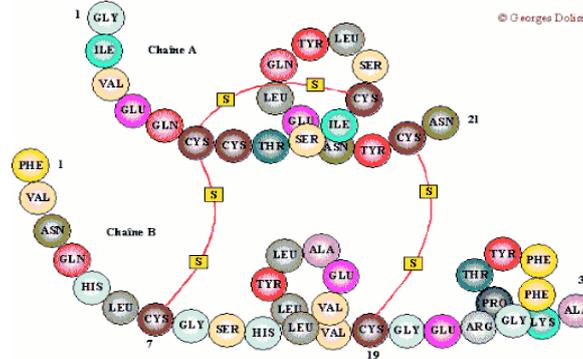
Remarque : un sonicat est la fraction obtenue après sonication.

INTERROGATION ORALE

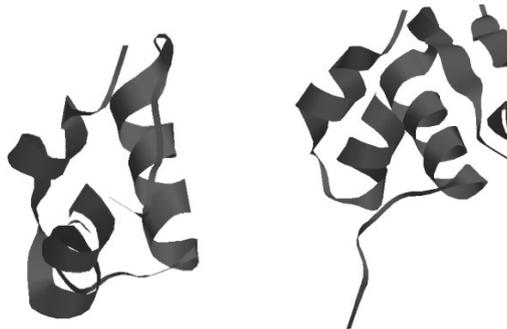
Purification de l'insuline

En vous appuyant sur les documents ci-dessous, expliquer les bases moléculaires et le principe de la purification de l'insuline.

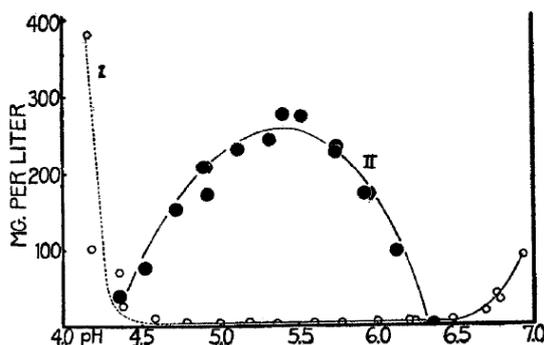
Document n°1 : Structure primaire de l'insuline



Document n°2 : Structure tridimensionnelle de l'insuline à $pH 7$ (à gauche) et à $pH 2$ (à droite)



Document n°3 : Solubilité d'une solution d'insuline en fonction du pH



Les ronds blancs représentent la solubilité de l'insuline en tampon acétate.
Les ronds noirs représentent la turbidité (caractère de ce qui est trouble) des suspensions.

Document n°4 : Protocole simplifié de purification d'insuline

Un extrait pancréatique a été obtenu.

L'ajout de sulfate d'ammonium à cet extrait conduit à la formation d'un précipité. Celui-ci est éliminé par filtration.

Le pH du filtrat est ensuite amené à 5,4. Après 48 heures, un précipité est obtenu puis récupéré par filtration.

Le précipité est alors redissous dans de l'eau distillée.

La solution ainsi obtenue est traitée par chromatographie d'exclusion sur un gel de Séphadex dont le domaine de fractionnement est 10-150 kDa.

L'insuline purifiée correspond aux dernières fractions recueillies présentant une absorbance à $\lambda = 280 \text{ nm}$.

INTERROGATION ORALE

Extraction et purification de l'ostéocalcine équine

Présenter la démarche employée pour l'extraction et la purification de l'ostéocalcine équine (OC) et les résultats obtenus présentés en annexe ci-dessous.

Document n°1 : Protocole d'extraction-purification

Des os longs sont prélevés sur un cadavre de poulain. Ils sont découpés en tranches d'une épaisseur de 5 mm à l'aide d'une scie d'anatomie. Les tranches d'os sont lavées à l'eau déminéralisée à + 4°C, puis congelées à - 80°C.

Le tissu osseux congelé est broyé au moyen d'un broyeur à percussion Fitzpatrick.

100 g de poudre d'os sont déshydratés dans 250 mL d'acétone durant 20 minutes. La poudre est lavée 4 fois avec 340 mL de tampon Tris-HCl (20 mmol·L⁻¹, pH 8), auquel est ajoutée une antiprotéase (phényl-méthyl-sulfonyl-fluorure 0,6 mmol·L⁻¹, ou PMSF).

Les solutions obtenues sont centrifugées à 1500 g pendant 15 minutes. Le culot final est récupéré, congelé puis lyophilisé.

40 g de la poudre lyophilisée sont déminéralisés pendant 4 heures avec 320 mL d'une solution d'acide formique et acide trifluoroacétique contenant 30 μmol·L⁻¹ de PMSF.

Après une heure d'incubation, la solution est centrifugée à 40 000 g durant 60 minutes. Le surnageant constitue l'extrait brut.

Les protéines extraites sont séparées par passage sur une colonne « Sep-Pak C₁₈ » de type chromatographie en phase inverse (greffée par des chaînes apolaires de 18 atomes de carbone).

La solution obtenue après passage sur la colonne « Sep-Pak C₁₈ » est chargée en 3 fois sur une colonne FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) « Superdex 75 » de type chromatographie d'exclusion-diffusion préalablement équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹, pH 8,0.

La dernière étape de purification de l'ostéocalcine équine est réalisée par passage sur une colonne FPLC « Mono-Q » de type chromatographie échangeuse d'anions équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹, pH 8,0.

Document n°2 : Résultat de la chromatographie échangeuse d'anions

Notes :

- Do à 280 nm = absorbance à 280 nm
- Molarité = concentration en quantité de matière, en mol·L⁻¹

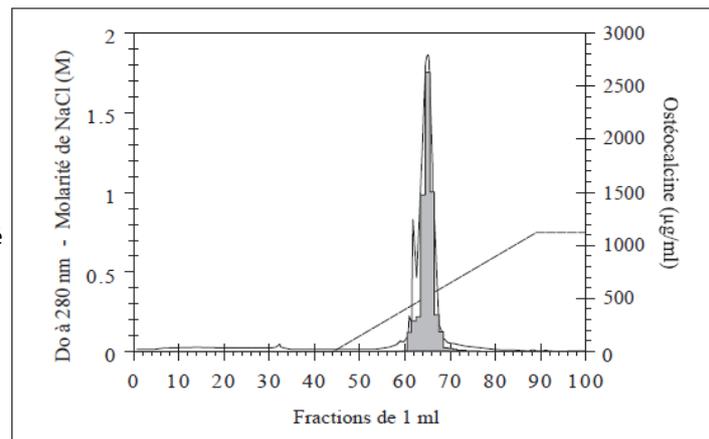


Figure 2 : Profil d'élué de la chromatographie FPLC de type échangeuse d'anions (Mono Q 5/5) équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Le gradient linéaire de NaCl est représenté par la ligne interrompue. La surface grise indique la concentration relative en ostéocalcine.

Document n°3 : Bilan de la purification

Tableau I : Rendements obtenus lors de la purification d'ostéocalcine (OC) équine.

Étapes	Protéines totales (mg) ⁽¹⁾	OC totale (mg) ⁽²⁾	Facteur de purification	Rendement total (%)
Extraction acide	519,62	18,5-	-	100
Sep-Pak C ₁₈	65,64	17,28	7,4	93,4
Superdex 75	19,09	8,66	1,7	46,8
Mono Q	8,55	6,34	1,63	34,3

(1) Déterminé selon la méthode de Lowry en utilisant la BSA (Fraction V) comme référence (Lowry et al., 1951).

(2) Déterminé par RIA hétérologue (trousse de dosage de l'OC bovine).

INTERROGATION ORALE

Purification de l'ostéocalcine équine

Présenter la démarche entreprise pour la purification de l'ostéocalcine équine (OC) en s'appuyant sur les documents présentés en annexe ci-dessous.

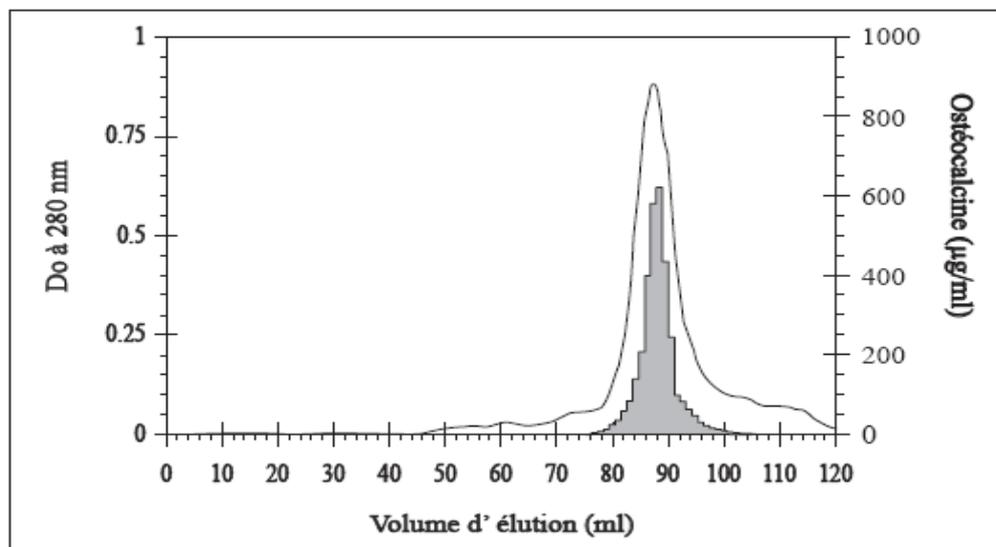


Figure 1: Profil d'éluion de la chromatographie FPLC de filtration sur gel (superdex 75 HiLoad 16/60) après chargement de la fraction 80 % méthanol de la chromatographie en phase greffée par chaîne apolaire en C₁₈ (Sep-Pak C₁₈). Les protéines sont éluées avec du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. La surface grise indique la concentration relative en ostéocalcine.

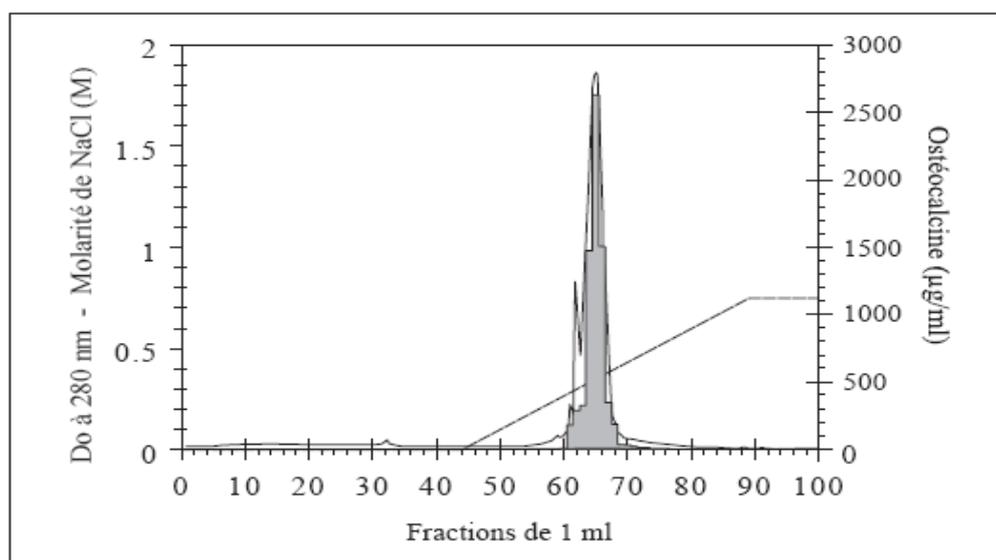


Figure 2: Profil d'éluion de la chromatographie FPLC de type échangeuse d'ions (Mono Q 5/5) équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Le gradient linéaire de NaCl est représenté par la ligne interrompue. La surface grise indique la concentration relative en ostéocalcine.

Tableau I : Rendements obtenus lors de la purification d'ostéocalcine (OC) équine.

Étapes	Protéines totales (mg) ⁽¹⁾	OC totale (mg) ⁽²⁾	Facteur de purification	Rendement total (%)
Extraction acide	519,62	18,5-	-	100
Sep-Pak C ₁₈	65,64	17,28	7,4	93,4
Superdex 75	19,09	8,66	1,7	46,8
Mono Q	8,55	6,34	1,63	34,3

(1) Déterminé selon la méthode de Lowry en utilisant la BSA (Fraction V) comme référence (Lowry et al., 1951).

(2) Déterminé par RIA hétérologue (trousse de dosage de l'OC bovine).

Notes :

- Sep-Pak C₁₈ : colonne de type chromatographie en phase inverse
- Superdex 75 : colonne de type chromatographie d'exclusion-diffusion
- Mono-Q : colonne de type chromatographie échangeuse d'anions
- FPLC : chromatographie liquide de protéine (Fast Protein Liquid Chromatography)
- Do à 280 nm = absorbance à 280 nm
- Molarité = concentration en quantité de matière, en mol.L⁻¹

INTERROGATION ORALE

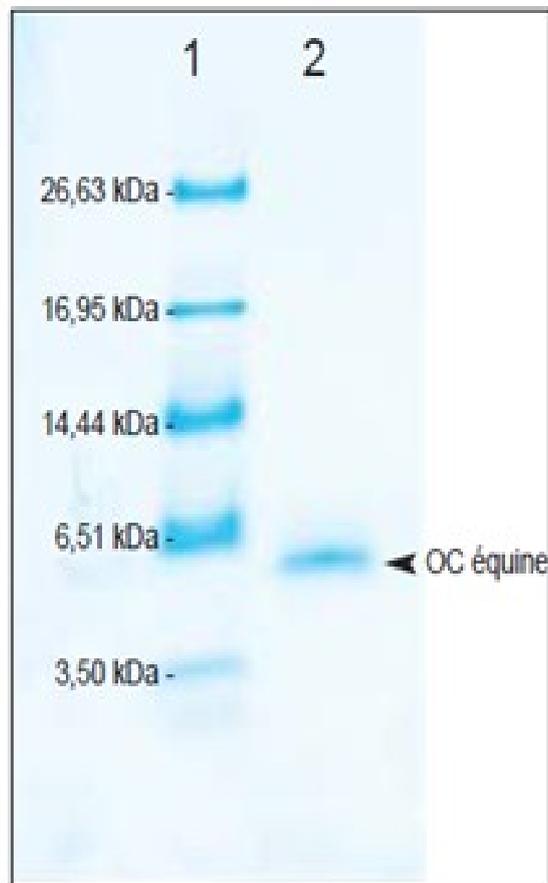
Purification de l'ostéocalcine équine et son contrôle

En s'appuyant sur les documents ci-dessous, présenter les méthodes utilisées pour purifier l'ostéocalcine équine (OC), et pour contrôler sa purification.

Document n°1 : Obtention d'une ostéocalcine purifiée

- 1) Un extrait d'os est obtenu et déposé sur une colonne de type chromatographie en phase inverse, greffée par des chaînes apolaires en C₁₈ (c'est-à-dire constituées de 18 atomes de carbone).
- 2) La solution obtenue est chargée sur une colonne de type chromatographie d'exclusion-diffusion préalablement équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹ - pH 8,0.
La comparaison du volume d'élution avec des marqueurs de masse molaire indique une masse molaire de l'ordre de 6 kDa.
- 3) La dernière étape de la purification de l'ostéocalcine équine est réalisée par passage sur une colonne de type chromatographie échangeuse d'anions équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mmol·L⁻¹ - pH 8,0.

Document n°2 : Contrôle de la purification par SDS-PAGE (gel à 16,5 %)



- Piste 1 : Marqueurs de masse molaire (triosephosphate isomérase - 26,625 kDa ; myoglobine - 16,950 kDa ; α -lactalbumine - 14,437 kDa ; aprotine - 6,512 kDa ; chaîne B de l'insuline - 3,496 kDa).
- Piste 2 : Fraction contenant l'ostéocalcine équine obtenue après passage sur la colonne de chromatographie échangeuse d'anions.

INTERROGATION ORALE

Purification de la *Green Fluorescent Protein*

La protéine fluorescente verte (de l'anglais *Green Fluorescent Protein*, et souvent abrégée GFP) est une protéine issue de la méduse *Aequorea victoria* ayant la propriété d'émettre une fluorescence. Elle peut être produite en tant que protéine recombinante par une souche d'*Escherichia coli* transformée.

À partir des documents fournis, présenter et analyser les méthodes utilisées pour extraire, purifier, et contrôler la purification de la GFP.

Document n°1 : Extraction protéique à partir d'une culture d'*Escherichia coli* transformée produisant la GFP

À partir de la culture d'*Escherichia coli* transformée exprimant la GFP :

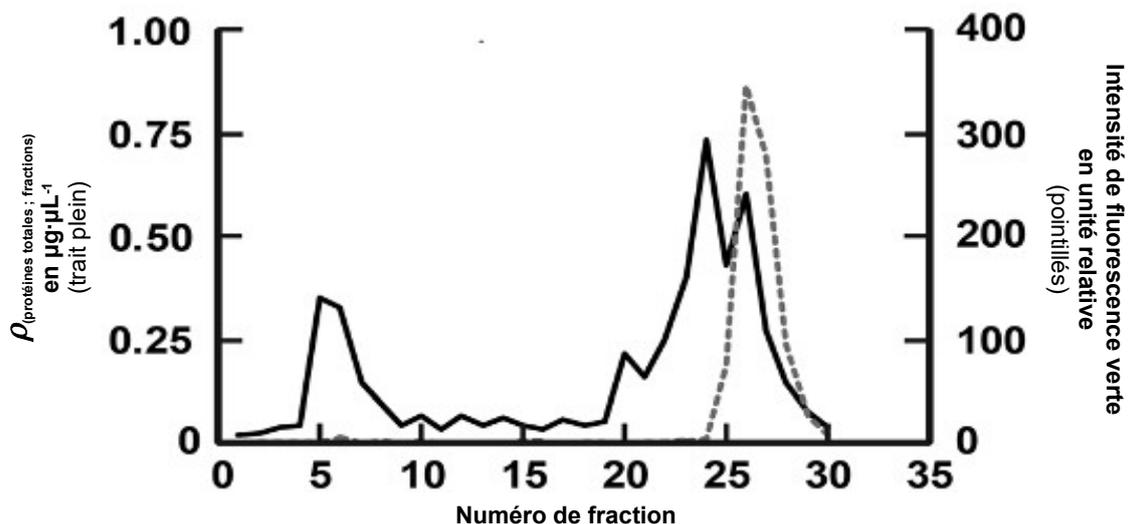
- 1) Centrifuger la culture pendant 12 minutes à 4500 rpm (rotations par minute).
- 2) Éliminer le surnageant.
- 3) Resuspendre le culot cellulaire par aspirations et refoulements avec 500 μL de tampon TE (Tris 1,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 0,3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ lysozyme 1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- 4) Réaliser une sonication sur la suspension cellulaire.
- 5) Transférer dans un microtube stérile de 2 mL.
- 6) Placer le tube au congélateur à -20°C pendant 24 heures.
- 7) Décongeler puis remettre au congélateur à -18°C pendant 24 heures (à répéter pendant 3 jours).
- 8) Récupérer et conserver à 4°C la fraction liquide qui est le lysat bactérien constituant l'extrait brut EB.

Document n°2 : Étape 1 de la purification de la GFP

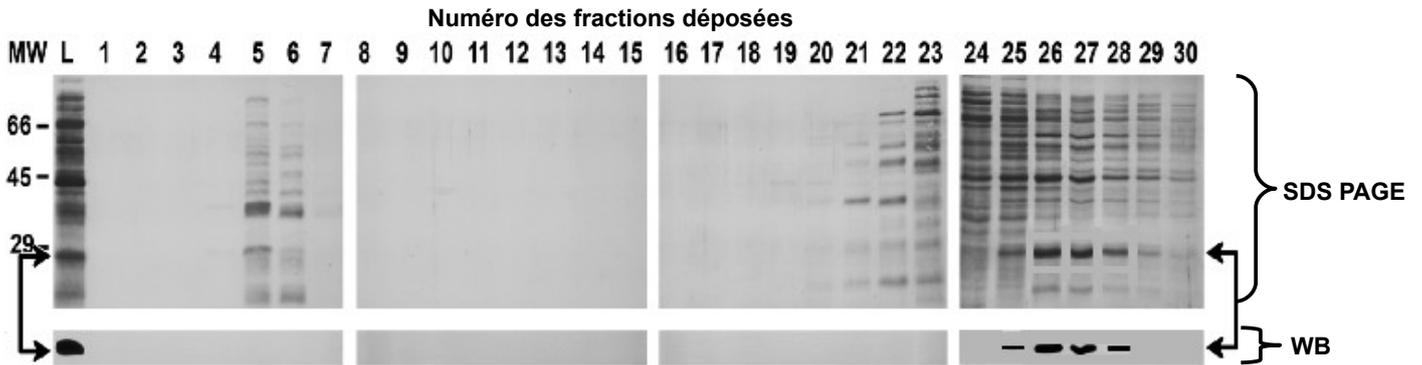
- Caractéristiques du système chromatographique mis en œuvre :

Nature de la résine :	Billes de sépharose de 34 μm de diamètre
Groupement greffé à la résine :	Groupement phényle : sépharose—O— 
Densité des groupements :	25 μmol de groupements phényles par mL de résine
Volume total de la colonne :	1 mL
pH d'utilisation de la colonne :	3 à 13
Débit d'élution utilisé :	1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Élution (phase mobile) :	Gradient linéaire décroissant de 2,4 à 0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'une solution de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Volume de recueil des fractions :	1 mL

- Profil d'élution obtenu à partir de l'extrait brut EB :



- Contrôle de l'étape 1 de la purification de la GFP par SDS PAGE à 12 % (révélation au bleu de Coomassie) et par western-blot (révélation par un anticorps anti-GFP conjugué à la peroxydase) :



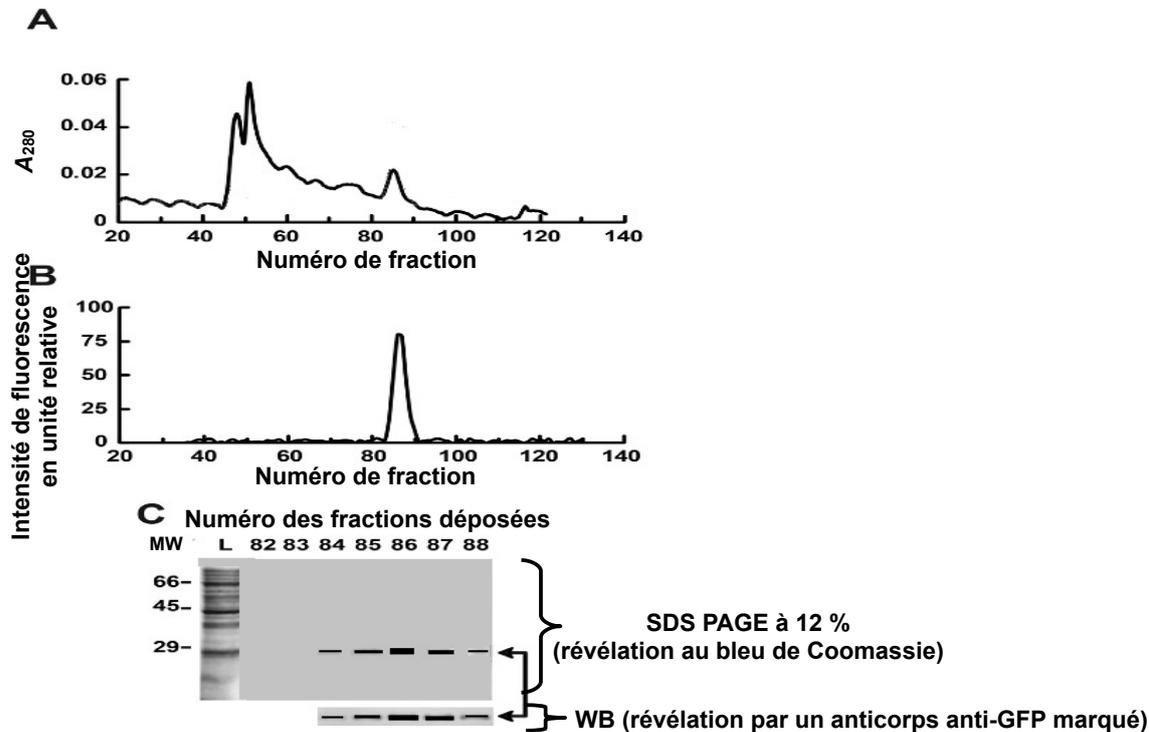
- Légendes :
- MW : Molecular Weight = masse molaire, en kDa.
 - Puits L : dépôt du lysat bactérien constituant l'extrait brut EB obtenu après extraction.
 - Puits 1 à 30 : dépôt des différentes fractions numérotées obtenues après chromatographie.
 - WB : résultats du western blot de la zone du gel SDS PAGE indiquée par les flèches.

Document n°3 : Étape 2 de la purification de la GFP

- Caractéristiques du système chromatographique mis en œuvre :

Nature de la résine :	« Superdex 200 – GE Life Sciences »
Domaine de fractionnement :	10 000 – 60 000 Da
Volume total de la colonne :	120 mL
Volume du dépôt de la fraction concentrée :	1 mL
Débit d'élution utilisé :	0,5 mL·min ⁻¹
Tampon d'élution (phase mobile) :	tampon HEPES à 10 mmol·L ⁻¹ + EDTA à 1 mmol·L ⁻¹ – pH 7,4
Volume de recueil des fractions :	1 mL

- Résultats de suivi et de contrôle de purification obtenus à partir d'une fraction regroupant les fractions protéiques issues de la première étape et identifiées comme contenant la GFP :



- Légendes du document n°3-C :
- MW : Molecular Weight = masse molaire, en kDa.
 - Puits L : dépôt du lysat bactérien constituant l'extrait brut obtenu après extraction.
 - Puits 82 à 88 : dépôt des différentes fractions numérotées obtenues après chromatographie.
 - WB : résultats du western blot de la zone du gel SDS-PAGE indiquée par les flèches.