

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage



Contrôle - Techniques chimiques pour la biologie
Filière SVI - Semestre S3
Durée (1H30min)

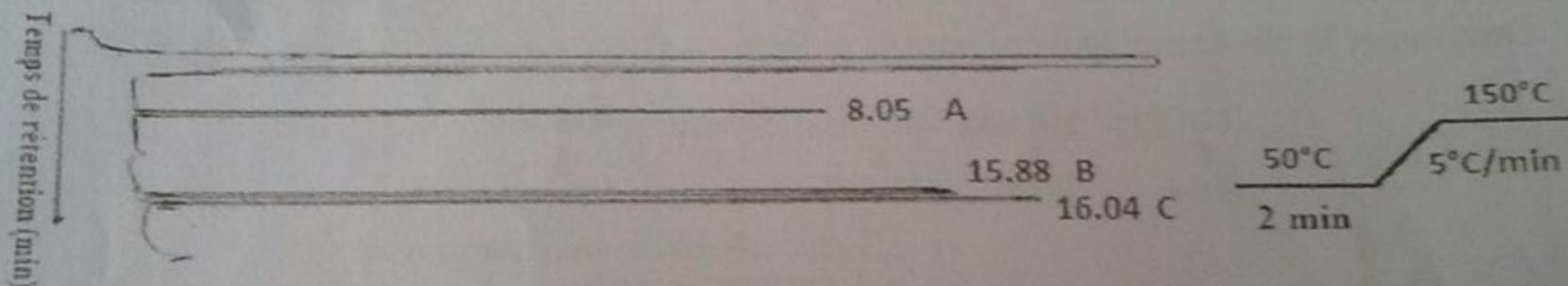
Exercice 1.

Pour réaliser l'extraction d'un composé A par une solution aqueuse d'hydrogencarbonate de sodium, une quantité de 5 g de ce composé est dissoute dans 100 mL d'acétate d'éthyle. Le composé A est plus soluble dans la phase aqueuse. Le coefficient de partage est de 0.05 ($K_D=1/20$).

- 1- Calculer le rendement d'extraction dans le cas d'une extraction simple avec 50 mL d'hydrogencarbonate de sodium et dans le cas d'une extraction multiple (2x25 mL) (2.5 pts)
- 2- Comparer les rendements dans les deux cas (MM de A = $125 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). (0.5 pts)

Exercice 2.

La séparation d'un mélange de composés volatils par CPG-FID sur une colonne CPSIL 5 ($d=0.32 \text{ mm}$; $df=1.2 \mu\text{m}$, $L=50 \text{ m}$) en mode programmation de température est illustrée par le chromatogramme ci-dessous. Le temps mort est de 3 min et les temps de rétention des alcanes sont : $tr_{C7}=7 \text{ min}$; $tr_{C8}=10 \text{ min}$; $tr_{C9}=17 \text{ min}$.



- a. En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur et en considérant que le débit D de la phase mobile est constant ($1 \text{ mL}/\text{min}$), déterminer le volume de la phase mobile dans la colonne ? Déterminer le volume de la phase stationnaire et le rapport des phases β . (0.75 pts)
- b. Déterminer les indices de rétention (IK) des composés A, B et C. (1.5 pts)
- c. Calculer la résolution entre les pics B et C. Les composés B et C seront-ils séparés si on augmente la pente à $10^\circ\text{C}/\text{min}$ (largeurs des pics à la base = 5 secondes). (2 pts)
- d. Comment peut-on réduire le temps d'analyse sur la même colonne et maintenir une bonne résolution (on suppose que les largeurs des pics à la base sont identiques et sont de l'ordre de 5 secondes). (1 pt)

Exercice 3

Pour purifier une enzyme à partir des embryons de blé, différentes techniques ont été réalisées. La purification a été suivie en mesurant l'activité enzymatique des fractions obtenues après chaque étape de la purification.

- Quelle est la source du matériel biologique ? (0.25 pts)

1. Première étape de la purification :

- a. Sachant que la première étape de purification est la précipitation des protéines avec des sels, citer les facteurs qui peuvent influencer la solubilité de ces protéines. (0.5 pts)
- b. Comme la nature du sel influence la solubilité des protéines, démontrer pourquoi le sulfate d'ammonium est souvent utilisé pour la précipitation des protéines. (2 pts)

- c. Après précipitation au sulfate d'ammonium à 60% de saturation, le culot et le surnageant sont séparés par centrifugation. L'activité enzymatique est mesurée dans le culot et dans le surnageant et on constate que seul le culot présente une activité. Donner le principe de la centrifugation et sur quelle partie (culot ou surnageant) faut-il poursuivre la purification ? Cette fraction est nommée F1 (fraction 1). (1.25 pts)

2. Deuxième étape de la purification :

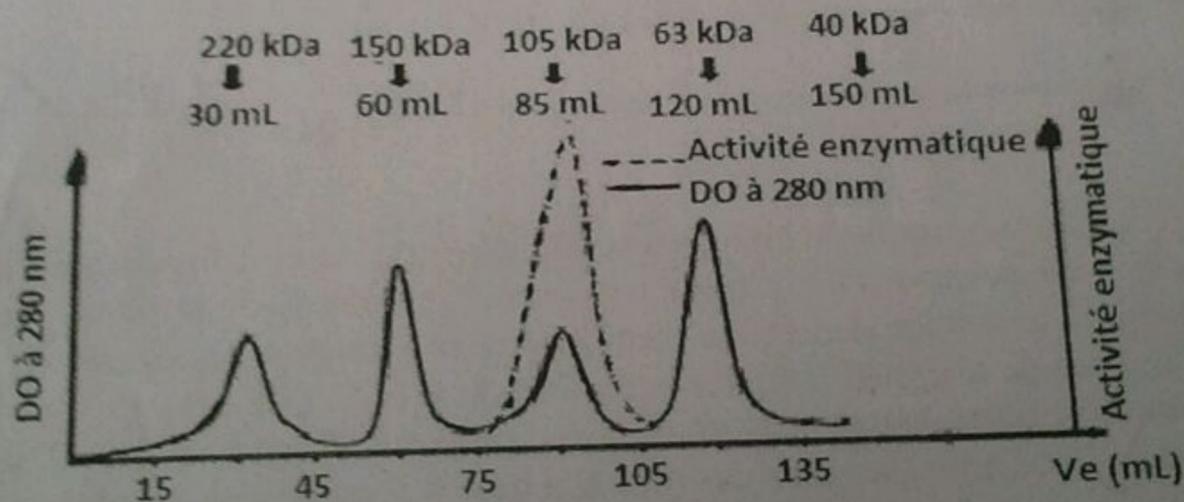
La fraction 1 (F1) a été purifiée par chromatographie sur une colonne de DEAE cellulose; cinq protéines sont éluées par diminution progressive du pH depuis pH 8 jusqu'à pH 3. Une seule fraction possède une activité enzymatique : la fraction F2, elle est éluée à pH 6. Les autres protéines sont éluées à pH 7 ; pH 5 ; pH 4.5 et à pH 4

- Pourquoi une colonne de DEAE cellulose est souvent utilisée à un pH inférieur à 9 ? Justifier votre réponse? (pKa du groupement DEAE : 9.4) (0.75 pt)
- Donner le principe de cette technique et le profil d'éluion des différentes protéines (1.75 pts)
- Que peut-on dire du pHi de l'enzyme ? (0.25 pts)

3. Troisième étape de la purification Sephadex G200

La fraction active F2 est déposée sur une colonne de chromatographie d'exclusion (Sephadex G200) et éluée par un tampon phosphate pH 7. Le profil d'éluion est représenté sur la Figure suivante. La colonne de Sephadex G200 a été calibrée avec des protéines de masses moléculaires connues dont les volumes d'éluion respectifs sont indiqués sur ce même schéma (flèches). Une seule fraction possède une activité enzymatique (fraction F3).

- Déterminer la masse moléculaire pour la protéine active (enzyme). (2.5 pts)



4. dernière étape de la purification (2.5 pts)

- Après purification de la fraction active F3 sur une colonne de chromatographie d'affinité Une seule protéine est éluée et elle possède une activité enzymatique. Compléter le tableau suivant :

Etapes de purification	Protéines totales (mg)	Activité enzymatique (µg/min)	Activité spécifique	rendement	Facteur de purification
1- Extrait cellulaire	85000	2000			
2- Sulfate d'ammonium	32500	1800			
3- Chromato-DEAE	185.00	1470			
5- Sephadex G200	55.00	1150			
6-Chromato-affinité	8.50	1030			

- Quelle est l'étape qui permet la plus grande purification de la protéine (meilleure efficacité) ?

3. Quelle est la nature de la phase stationnaire

.....
.....

4. Quelle serait l'allure du chromatogramme si on augmente la proportion du méthanol dans la phase mobile?

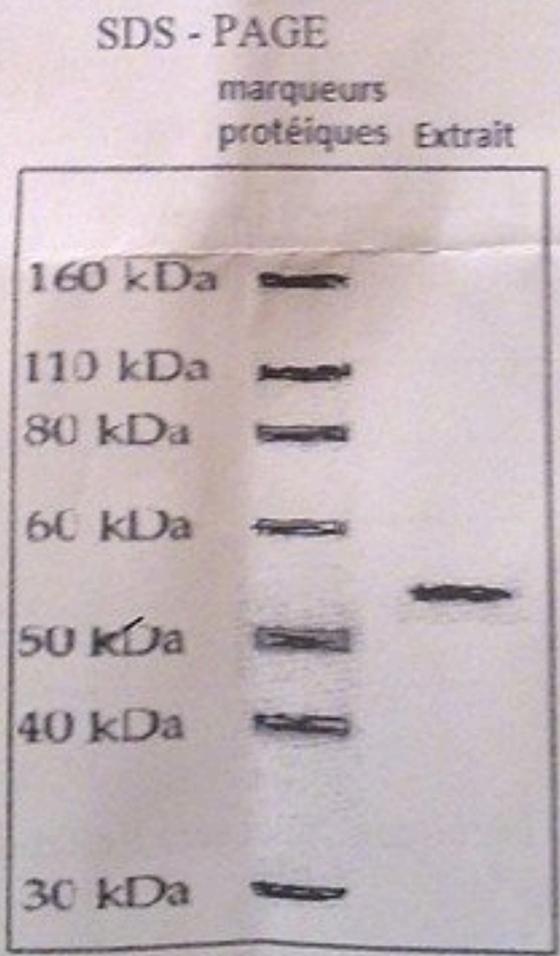
.....
.....
.....

5. La nature de l'éluant pourrait-elle influencer le temps de rétention des constituants ?

.....

Exercice II

Après plusieurs étapes de purification d'une enzyme, une électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée et une seule bande est visualisée.



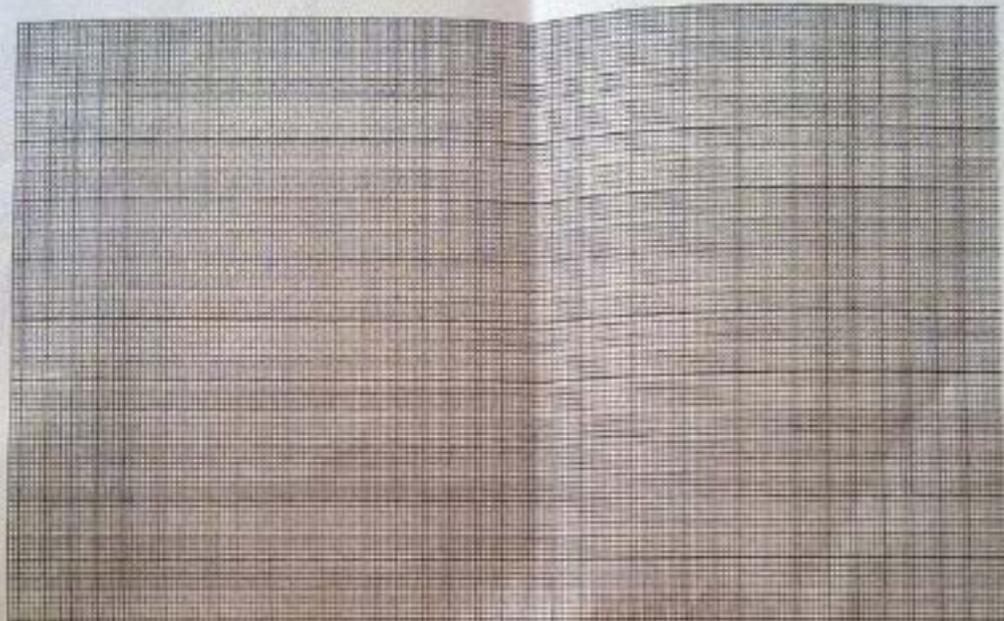
Une seconde électrophorèse de l'échantillon sous des conditions *natives* (non-dénaturantes) a montré la présence de deux bandes après coloration du gel.

1. Comment peut-on expliquer ces observations

.....
.....
.....

2. Quelle sera l'influence de l'ajout de mercaptoéthanol sur la migration de l'enzyme

3. Déterminer le PM de l'enzyme



Exercice III

Un mélange de 4 protéines : A (pHi 4.5) ; B (pHi 5), C (pHi 7) et D (pHi 11) est déposé sur une colonne de CM-cellulose ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$; pka 4.76).

1. Déterminer la proportion des groupements fonctionnels chargés à pH 4.76 ; à pH 7 et à pH 11 ?

2. Quelles sont les protéines qui seront retenues par la CM-cellulose à pH 4.76 ; à pH 7 et à pH 11 ?

	pH 4.76	pH 7	pH 11	Rétention
A				
B				
C				
D				