

Béjaïa

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

République Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Concours d'accès en doctorat Sciences Biologiques 2019-2020

Spécialité : Biochimie Appliquée

Epreuve : Méthodes et Techniques d'Analyse (Durée : 02h00)

Partie II : (10 pts)

1. Vous avez préparé deux solutions de solutés connus, A et B, dans deux flacons identiques et par maladresse vous avez oublié d'étiqueter les flacons :
 - a. Quelles serait la méthode d'analyse spectroscopique la plus simple et rapide qui pourrait vous aider à résoudre le problème ? (1pts)
 - b. En expliquer brièvement le principe (1pts)
 - c. Vous voulez vous assurer des concentrations, comment allez vous procéder ? (1pts)
2. Vous souhaitez réduire la polarité d'un triacide organique ($R-(COOH)_3$) pour en faciliter l'incorporation dans une émulsion, vous décidez de réaliser l'estérification de cet acide avec un alcool gras ($OH-C_nH_{2n}-CH_3$). Vous devez alors vous assurer de la formation de l'ester et de sa stabilité dans le milieu réactionnel :
 - a. En vous basant sur le principe de la réaction d'estérification, (donner la réaction), comment assurer la stabilité de l'ester et sa persistance après formation? (2 pts)
 - b. Quelle serait la méthode spectrométrique qui pourrait démontrer la liaison entre l'acide et l'alcool ? et expliquer brièvement le principe ? (2pts)
 - c. Sachant que la réaction d'estérification n'est jamais complète, vous souhaitez connaître le rendement de la réaction d'estérification et de connaître ce qui reste des réactifs mis en œuvre (acide et alcool). Vu qu'il s'agit ici d'un mélange réactionnel en milieu liquide, proposez une méthode qui vous permettra d'identifier les réactifs et le(s) produit(s) de la réaction et de les quantifier :
 - donner un schéma explicatif du principe général. (2pts)
 - donner une représentation schématique d'un signal caractéristique (1pts).

Bonne réflexion

Concours d'accès en doctorat Sciences Biologiques 2019-2020
Spécialité : Biochimie Appliquée

Epreuve : Méthodes et Techniques d'Analyse (Durée : 02h00)

Problématique I. (10 points)

I.1/ (06 points) La protéine E est une enzyme ayant une affinité pour des séquences sur la molécule d'ADN. Elle est purifiée à partir du surnageant de culture bactérienne par centrifugation, suivi d'un protocole contenant trois autres étapes (**Tableau 1**). Le précipité est centrifugé et soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium. Le précipité est récupéré par centrifugation, resolubilisé, dialysé contre un tampon Tris-HCl 50 mM pH 9 (tampon A) et chargé sur une colonne de DEAE-cellulose (chromatographie échangeuse d'anions) (**Figure 1**). L'élution des protéines est réalisée à l'aide d'un gradient de 0 à 1M NaCl dans le tampon A. Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées, concentrées et chargées sur une colonne de séphadex G50 équilibrée en tampon (chromatographie d'exclusion). Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées et constituent le pool d'enzyme purifiée. Les fractions issues des différentes étapes de purification sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (**Figure 2**).

Table 1 : Bilan des étapes de purification de l'enzyme E

| Etapes | Activité enzymatique totale (U) | Quantité de protéines totale (mg) | Activité spécifique (U/mg) | Facteur de purification | Rendement de purification (%) |
|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Surnageant de culture centrifugée | 1413 | 673 | | | |
| Précipitation au sulfate d'ammonium | 1215 | 308 | | | |
| Chromatographie Echangeuse d'anions | 438 | 17.4 | | | |
| Chromatographie d'exclusion | 342 | 10 | | | |

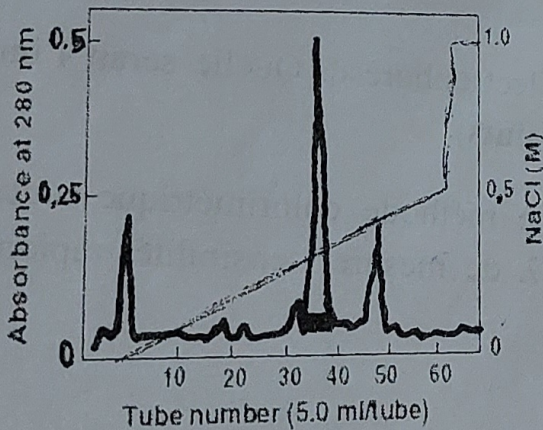


Figure 1 : Profil de la chromatographie échangeuse d'anions

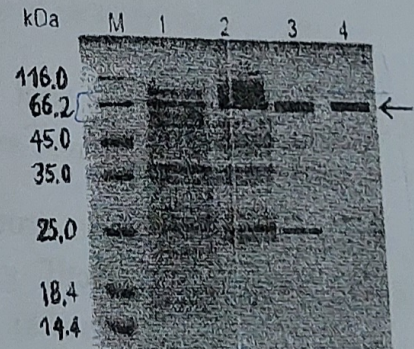



Figure 2 : Profil d'électrophorèse en conditions dénaturantes. M : marqueurs de poids moléculaires. 1 : ... ?, 2 : ... ?, 3 : ... ?, 4 : ... ?

Questions :

- 1)-Après avoir défini les termes activité spécifique, facteur de purification et rendement de purification, compléter le **tableau 1. (2points)**
 - 2)- Après avoir donné le principe de la chromatographie échangeuse d'anions, commentez le profil d'éluion de la **figure 1**. Que représente la mesure de l'absorbance à 280 nm ? Comment peut-on repérer les fractions contenant l'enzyme ? Quelle information concernant le pHi de l'enzyme peut-on en déduire? **(2points)**
 - 3)- Après avoir donné le principe de l'électrophorèse en conditions dénaturantes, analyser la **figure 2**, tout en complétant son titre (**Lignes 1, 2, 3 et 4**). Quelle information avez-vous concernant la masse molaire de l'enzyme? **(2points)**
- I.2/** Des fragments d'ADN de même taille sont mélangés à l'enzyme E. Le site de fixation de la protéine sur le fragment de l'ADN  a été permuté (voir la **figure ci-dessous**) donnant les structures allant de 1 à 7.



Les complexes ADN-protéines sont soumis à une autre électrophorèse. Quelle serait l'image observée sur le gel d'électrophorèse avec explications **(02 points)**.

- Dans le but de quantifier la protéine E, Proposez une méthode colorimétrique toute en indiquant (la référence, le réactif, groupements réactifs, λ de mesure, sensibilité, rapidité et complexité, interférence) **(02 points)**.