

TD : Exercices d'Application et Évaluation des Connaissances

Partie 1 : Exercices d'Application Approfondis

Exercice 1 : Centrifugation (Calculs de paramètres)

Un technicien doit séparer des chloroplastes d'un homogénat de feuille d'épinard à l'aide d'une ultracentrifugeuse. Le rotor utilisé est un rotor fixe n°8. Voici ses caractéristiques :

· $r_{\min} = 5,5 \text{ cm}$ · $r_{\max} = 11,5 \text{ cm}$ · Vitesse maximale = 45 000 tr/min

1. Il utilise une vitesse de 40 000 tr/min. Calculez la RCF moyenne ($r_{\text{avg}} = (r_{\min} + r_{\max})/2$) appliquée aux chloroplastes dans ce rotor.
2. Calculez le facteur k de ce rotor à sa vitesse maximale. Que vous indique la valeur de k sur l'efficacité du rotor ?
3. Le facteur k pour sédimenter complètement les chloroplastes est estimé à 1200. Combien de temps minimum (en heures) de centrifugation à 45 000 tr/min sera nécessaire ?

Exercice 2 : Spectrophotométrie (Dosage et Interprétation)

Vous souhaitez déterminer la concentration en protéines totales d'un extrait de levure en utilisant la méthode de Bradford. Vous préparez une gamme étalon avec de la Sérum Albumine Bovine (BSA) et obtenez les résultats suivants :

[BSA] ($\mu\text{g/mL}$) Absorbance à 595 nm 0 /0,000 ; 10 /0,085 ; 20 /0,155 ; 50 /0,390 ; 100 /0,810

L'échantillon d'extrait de levure, dilué 50 fois, donne une absorbance de 0,350.

1. Tracez la courbe d'étalonnage $A = f(\text{[BSA]})$ et déduisez-en l'équation de la droite de régression.
2. Calculez la concentration en protéines de l'échantillon dilué, puis de l'échantillon initial (en $\mu\text{g/mL}$ et en mg/mL).
3. Question bonus : Pourquoi utilise-t-on une dilution aussi importante (50x) pour cet échantillon ? Que se passerait-il si on mesurait l'échantillon non dilué ?

Exercice 3 : Électrophorèse (Analyse de gel)

Vous analysez par SDS-PAGE un échantillon de protéine purifiée et un marqueur de poids moléculaire. Après migration et coloration, vous obtenez le schéma de gel suivant : (Imaginez un schéma avec une ligne pour le marqueur (M) avec des bandes à 10, 15, 25, 37, 50 et 75 kDa, et une ligne pour l'échantillon (E) avec une unique bande épaisse située entre les bandes 37 et 50 kDa du marqueur.)

1. Estimez le poids moléculaire apparent de la protéine purifiée. Justifiez votre raisonnement.
 2. Proposez une interprétation pour expliquer pourquoi la bande observée est "épaisse" et non fine et nette.
 3. Si vous réalisiez une électrophorèse en conditions natives (non dénaturantes) sur le même échantillon, à quoi pourriez-vous vous attendre comme résultat ? Pourquoi ?
-

Partie 2 : QCM (20 questions)

Cochez la seule réponse exacte pour chaque question.

Thème : Centrifugation

1. La force centrifuge relative (RCF) : a) S'exprime en tr/min. b) Est indépendante du type de rotor utilisé. c) Est proportionnelle au carré de la vitesse de rotation. d) Est plus faible au fond du tube que près de l'axe. e) Est négligeable pour les ultracentrifugeuses.

- La centrifugation isopycnique permet de séparer des particules principalement sur le critère de : a) Leur masse. b) Leur forme. c) Leur taille. d) Leur charge électrique. e) Leur densité.
- Pour un rotor donné, un facteur k plus faible signifie que : a) La centrifugation sera moins efficace. b) Le rotor est moins rapide. c) Le temps de centrifugation nécessaire sera plus long. d) Le rotor est plus efficace pour sédimenter une particule. e) La force centrifuge est plus faible.
- Lors d'un fractionnement subcellulaire, quel organelle est sédimenté en premier ? a) Les ribosomes. b) Le noyau. c) Les mitochondries. d) Les microsomes. e) Le cytosol.
- La clarification d'un extrait cellulaire brut (élimination des débris) se fait généralement par : a) Ultracentrifugation en gradient de sucrose. b) Centrifugation à basse vitesse. c) Centrifugation isopycnique. d) Ultracentrifugation à 100 000 g. e) Aucune de ces réponses.

Thème : Spectrophotométrie

- La Loi de Beer-Lambert stipule que l'Absorbance (A) est : a) Proportionnelle à la concentration. b) Inversement proportionnelle à la concentration. c) Proportionnelle à la transmission. d) Indépendante de la longueur d'onde. e) Toujours égale à 1 pour une concentration saturante.
- Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'une molécule : a) Dépend de la concentration de la solution. b) Est une constante pour une molécule donnée à une longueur d'onde donnée. c) Diminue lorsque la largeur de la cuve augmente. d) S'exprime en $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. e) Est plus élevé pour une solution incolore.
- Une solution présente une absorbance de 2,0. Quel pourcentage de lumière est transmis ? a) 2% b) 20% c) 1% d) 0,1% e) 100%
- La spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) nécessite une source de lumière spécifique : a) Une lampe à filament de tungstène. b) Une lampe à deutérium. c) Une lampe cathodique creuse (HCL). d) Un laser à argon. e) La source n'a pas d'importance.
- Dans la méthode de Bradford, le réactif forme un complexe coloré avec les protéines qui absorbe à : a) 260 nm b) 280 nm c) 340 nm d) 595 nm e) 750 nm

Thème : Électrophorèse

- Dans une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), la séparation des protéines se fait principalement selon : a) Leur charge nette. b) Leur point isoélectrique (pI). c) Leur activité enzymatique. d) Leur masse moléculaire. e) Leur affinité pour un anticorps.
- Le SDS (dodécyl sulfate de sodium) a pour fonction principale : a) De colorer les protéines. b) De réduire les ponts disulfures. c) De donner une charge négative uniforme aux protéines. d) De polymériser le gel de polyacrylamide. e) De tamponner le pH du gel.
- Lors d'une migration en condition native (non dénaturante), la vitesse de migration d'une protéine dépend : a) Uniquement de sa masse. b) Uniquement de sa charge. c) De sa charge, de sa taille et de sa forme. d) Uniquement de son point isoélectrique. e) D'aucun de ces facteurs.
- La première dimension d'une électrophorèse bidimensionnelle (2D) est : a) Une SDS-PAGE. b) Une chromatographie d'exclusion. c) Une isoelectrofocalisation (IEF). d) Une centrifugation différentielle. e) Un Western Blot.
- Pour visualiser une protéine spécifique après électrophorèse, on utilise principalement : a) La coloration au Bleu de Coomassie. b) La coloration au nitrate d'argent. c) La technique de Western Blot. d) La simple observation à la lumière UV. e) La mesure de la radioactivité.

Généralités

- Quelle technique est la plus appropriée pour séparer des organites cellulaires intacts ? a) Spectrophotométrie UV-Vis. b) Électrophorèse sur gel d'agarose. c) Centrifugation différentielle. d) Chromatographie gazeuse. e) Électrophorèse capillaire.
- Quelle technique est la plus appropriée pour doser avec une grande spécificité la concentration en zinc (Zn^{2+}) dans une plante ? a) Spectrophotométrie UV-Vis. b) Centrifugation en gradient de sucrose. c) Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA). d) Électrophorèse native. e) SDS-PAGE.
- Le bleu de bromophénol dans le tampon de chargement en électrophorèse sert à : a) Colorer toutes les protéines. b) Réduire les ponts disulfures. c) Visualiser le front de migration. d) Donner une charge aux protéines. e) Augmenter la densité de l'échantillon.

- Un spectrophotomètre UV-Vis standard n'est pas équipé pour fonctionner en dessous de 340 nm car : a) Les cuves en plastique ou verre absorbent les UV. b) Le détecteur ne fonctionne que dans le visible. c) La source ne émet pas d'UV. d) Il n'y a pas de monochromateur. e) C'est faux, il fonctionne parfaitement en UV.
- Lors d'un dosage spectrophotométrique, l'utilisation d'une cuve en quartz est indispensable pour : a) Toutes les mesures dans le visible. b) Toutes les mesures dans l'UV (<340 nm). c) Mesurer l'absorbance de solutions très concentrées. d) Éviter la fluorescence. e) Aucune de ces réponses, le plastique suffit toujours.

Partie 3 : Résolution des Exercices et Réponses du QCM

Résolution de l'Exercice 1 : Centrifugation

- Calcul de la RCF moyenne : $r_{avg} = (5,5 + 11,5) / 2 = 8,5 \text{ cm} = 0,085 \text{ m}$ · $N = 40\,000 \text{ tr/min} \Rightarrow \omega = (2\pi \cdot N) / 60 = (2 \cdot 3,14 \cdot 40000) / 60 \approx 4186,67 \text{ rad/s}$ · $RCF = \omega^2 \cdot r / g = (4186,67)^2 \cdot 0,085 / 9,81 \cdot RCF \approx (17\,500\,000) \cdot 0,085 / 9,81 \approx 151\,600 \text{ g}$ · On peut aussi utiliser la formule approchée : $RCF = 1.118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2 = 1.118 \cdot 10^{-5} \cdot 8,5 \cdot (40000)^2 \approx 152\,000 \text{ g}$
- Calcul du facteur k à 45 000 tr/min : $k \approx (2.53 \cdot 10^{11}) / (N^2) \cdot \ln(r_{max} / r_{min}) \cdot \ln(11.5 / 5.5) = \ln(2.09) \approx 0,737$ · $k \approx (2.53 \cdot 10^{11}) / (45000^2) \cdot 0,737 \approx (2.53 \cdot 10^{11}) / (2.025 \cdot 10^9) \cdot 0,737 \approx 124.94 \cdot 0,737 \approx 92.1$ · Un faible facteur k (92.1) indique une très haute efficacité. Le rotor est capable de sédimenter des particules rapidement.
- Calcul du temps de centrifugation : $k = 92.1$ (pour le rotor à 45 000 tr/min) · $k_{requis} = 1200$ (pour les chloroplastes) · On utilise la relation : $k_{requis} / k_{rotor} = t_{rotor} / t_{requis} \Rightarrow t_{requis} = (k_{requis} / k_{rotor}) \cdot t_{rotor}$ · Ici, t_{rotor} est le temps pour lequel le k_{rotor} est donné, c'est-à-dire le temps pour sédimenter une particule de référence à la vitesse max. Par définition, le facteur k est le temps (en heures) requis pour sédimenter une particule avec un coefficient de sédimentation de 1S à la vitesse maximale du rotor. Donc, pour une particule avec $s=1S$, $t=k$. · Pour nos chloroplastes, le temps nécessaire est : $t = k_{requis} \cdot (k_{rotor} / k_{rotor}) \dots$ La relation est simplement $t = k_{requis} / k_{rotor}$ pour la vitesse du rotor considérée. · $t = 1200 / 92.1 \approx 13.03 \text{ heures}$.

Résolution de l'Exercice 2 : Spectrophotométrie

- Courbe d'étalonnage : · L'équation de la droite de régression linéaire ($A = \epsilon \cdot l \cdot C$) obtenue graphiquement ou par calcul est approximativement $A = 0,0081 \cdot [BSA]$. (La pente est d'environ 0,0081 absorbance/($\mu\text{g/mL}$). La droite passe par l'origine).
- Calcul de la concentration : · Pour $A = 0,350$, $[BSA]_{diluée} = A / \text{pente} = 0,350 / 0,0081 \approx 43,21 \mu\text{g/mL}$. · L'échantillon initial a donc été dilué 50 fois. Sa concentration est donc : $[Prot]_{initiale} = 43,21 \mu\text{g/mL} \cdot 50 = 2160,5 \mu\text{g/mL}$, soit 2,16 mg/mL.
- Question bonus : L'échantillon est dilué 50 fois car sa concentration en protéines est très élevée. Si on mesurait l'échantillon non dilué, son absorbance serait bien supérieure à 1,0 ($A \approx 2,16 \cdot 1000 / 100 \cdot 0.0081$? Let's calculate properly: For $[Prot] = 2160 \mu\text{g/mL}$, A would be $0.0081 \cdot 2160 \approx 17.5$). Cette absorbance est bien en dehors de la gamme linéaire du spectrophotomètre (généralement $A < 1,5-2$), où la loi de Beer-Lambert n'est plus respectée. Le résultat serait donc inexact.

Résolution de l'Exercice 3 : Électrophorèse

- Poids moléculaire : La bande de l'échantillon (E) se situe entre les marqueurs 37 kDa et 50 kDa. En interpolant visuellement, on peut estimer son poids moléculaire apparent aux alentours de 42-45 kDa.
- Bande épaisse : Une bande épaisse et diffuse peut avoir plusieurs causes : dénaturation incomplète de la protéine, présence de plusieurs formes de la protéine (glycosylation différente, dégradation partielle), ou surcharge de l'échantillon dans le puits.
- Électrophorèse native : En condition native, la migration ne dépend pas que de la masse mais aussi de la charge nette et de la forme native de la protéine. Il est donc très probable que le résultat soit différent : la protéine pourrait migrer plus ou moins loin, et la bande pourrait avoir un aspect différent. On pourrait même observer plusieurs bandes si la protéine native est un complexe oligomérique (ex: un dimère).

Réponses Justes du QCM

- c) Est proportionnelle au carré de la vitesse de rotation.
- e) Leur densité.

3. d) Le rotor est plus efficace pour sédimenter une particule.
4. b) Le noyau.
5. b) Centrifugation à basse vitesse.
6. a) Proportionnelle à la concentration.
7. b) Est une constante pour une molécule donnée à une longueur d'onde donnée.
8. c) 1% (Car $A = 2 = \log(I_0/I) \Rightarrow I_0/I = 10^2 = 100 \Rightarrow \%T = I/I_0 * 100 = 1/100 * 100 = 1\%$)
9. c) Une lampe cathodique creuse (HCL).
10. d) 595 nm
11. d) Leur masse moléculaire.
12. c) De donner une charge négative uniforme aux protéines.
13. c) De sa charge, de sa taille et de sa forme.
14. c) Une iséoélectrofocalisation (IEF).
15. c) La technique de Western Blot.
16. c) Centrifugation différentielle.
17. c) Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA).
18. c) Visualiser le front de migration.
19. a) Les cuves en plastique ou verre absorbent les UV. (Le quartz est nécessaire pour les UV).
20. b) Toutes les mesures dans l'UV (<340 nm).