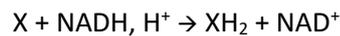


Sujet enzymologie

Vous purifiez une enzyme d'oxydoréduction à partir d'une culture de bactéries. Afin de mesurer le degré de purification vous mesurez l'activité spécifique de vos extraits à chaque étape. La mesure l'activité spécifique s'effectue dans une microcuve de 0,7 cm de trajet optique avec un volume réactionnel total de 500 μL .

La réaction réalisée est la suivante



Pour vos mesures les deux substrats sont apportés en large excès. L'unité de quantité catalytique utilisée ici sera l'unité U. On donne le coefficient d'extinction molaire du NADH, H^+ à 340 nm = 6300 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}$.

- 1) Donnez la définition de l'unité U
- 2) Pourquoi les deux substrats sont apportés en excès, que peut-on en conclure ?

Vous partez d'une solution A qui est un lysat de culot de bactéries. La mesure de l'activité enzymatique de la solution A est effectuée à partir d'une prise d'essai de 0,2 mg de protéines totales. La variation d'absorbance lue à 340 nm pendant 2 min est de 0,5. Les conditions de vitesse initiale ont été validées.

- 3) Calculez la concentration catalytique dans la cuve réactionnelle
- 4) Déduisez en l'activité spécifique (en U/g) dans le lysat A

Une étape de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion sur gel qui permet d'éluer une fraction d'intérêt avec un pic de masse moléculaire apparente de 120 kDa. L'analyse de cette fraction éluée (solution B) est effectuée sur une prise d'essai de 0,5 μg de protéines totales. La variation d'absorbance lue à 340 nm pendant 1 min est de 0,2. (il est toujours vérifié que vous êtes bien en condition de vitesse initiale).

- 5) Calculez le degré de purification de cette étape.

La solution B est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl-sulfate après traitement de la solution B par le bêta-mercaptoéthanol. Après migration, la révélation du gel par le bleu de coomassie donne une bande unique de masse moléculaire apparente de 40 kDa.

- 6) Décrivez la méthode du SDS-PAGE appliquée ici et ce qu'elle donne comme information.
- 7) Que pouvez-vous conclure sur la nature de l'enzyme bactérienne ?
- 8) Calculez l'activité moléculaire spécifique de l'enzyme étudiée
- 9) Déduisez en le temps de rotation de l'enzyme.

Proposition de correction :

- 1) Donnez la définition de l'unité U

L'unité U se définit comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole de substrat par minute dans les conditions standardisées de vitesse initiale. (3 points)

- 2) Les deux substrats sont apportés en large excès on se trouve donc dans les conditions idéales (avec sous-entendu un pH optimum fixé par le tampon *ad hoc*, et une température optimale thermostatée) pour la mesure d'une activité enzymatique. De plus, on en déduit que nous nous trouvons ainsi en condition de V_{max} et donc que nous mesurons la capacité catalytique maximale dans les conditions opératoires fixées. (3 points)

- 3) Concentration catalytique de A

Mesure de l'activité en utilisant la loi de Beer Lambert :

$$AE_{cuve} = \Delta A / \Delta t \times 1 / \epsilon l \quad \text{donc } AE_{cuve} = 0,5 / 2 \times 1 / (6300 \times 0,7) = 5,669 \cdot 10^{-5} \text{ mole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Soit une Conc Catal dans la cuve de 56,69 U/L (6 points)

- 4) Cette CC cuve a été obtenue pour un mélange réactionnel contenant 0,2 mg de protéines totales dans 500 μL soit un mélange réactionnel de 0,4 g/L

->Activité spécifique de la solution A = conc catl/conc en protéines totales

$$\text{Soit } AS_A = 56,69 / 0,4 = 141,725 \text{ U/g}$$

(6 points)

- 5) Pour B on applique le même raisonnement

$$CC_B = 0,2 / 1 \times 1 / (6300 \cdot 0,7) = 45,35 \text{ U/L}$$

$$\text{Concentration en protéines : } 0,5 \cdot 10^{-6} / 500 \cdot 10^{-6} = 0,01 \text{ g/L}$$

$$AS_B = 4535,1 \text{ U/g}$$

$$\text{Degré de purification : } AS_B / AS_A = 4535,1 / 141,725 = 32 \text{ (sans unité)}$$

(9 points)

- 6) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante, le b-mercaptoéthanol rompt les ponts di-sulfures intra- et inter-chaines, le SDS dénature et linéarise les protéines permettant une séparation en fonction de leur masse moléculaire apparente, le bleu de Coomassie révèle toutes les protéines de façon non spécifique. On en déduit que B est constitué après dénaturation d'un peptide unique de MM 40 kDa. Donc la fraction B est pure et comme la chromatographie d'exclusion donnait avant dénaturation une MM de 120 kDa notre enzyme est probablement un trimère de 40 kDa (rq : pas très cohérent car en général les oligomères plutôt des multiples de 2) (4 points)

- 7) $V_{max} = K_{cat} \cdot [E]_{tot}$ avec une concentration molaire de protéine

Ici nous sommes en condition de V_{max} , donc AS_B équivaut à 4535,1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ en condition de V_{max} .

$$K_{act} = V_m / [E]_{tot}$$

$$\text{Pour une solution à } 1 \text{ g/L (pour pouvoir se retrouver avec une vitesse maximale en équivalent de mol/L/min) soit } 1/40\,000 \text{ M cela nous donne une } K_{cat} = 4535,1 \cdot 10^{-6} / (1/40\,000) = 181,4 \text{ min}^{-1}$$

(6 points)

- 8) Temps de rotation c'est $1/k_{cat} = 1/181,4 = 0,0055 \text{ min}$ ou 0,33 sec. (3 points)