

**Exercice 1 :**

Le tableau suivant sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Interpréter les résultats.

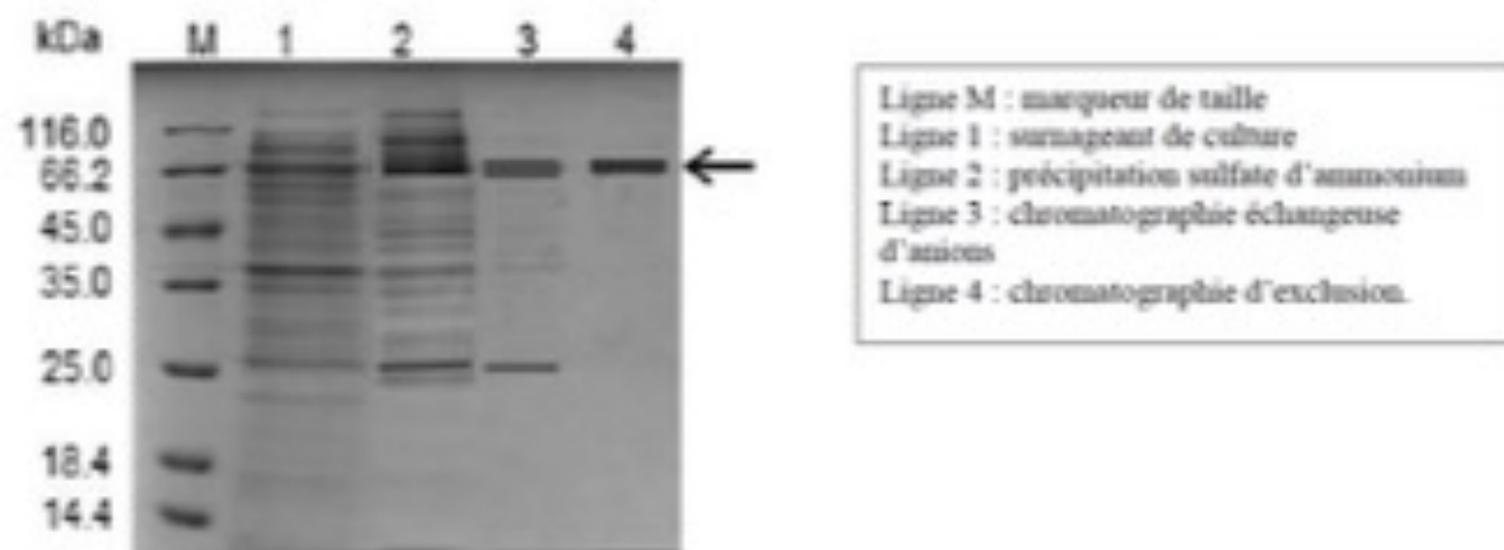
<b>Étape</b>	<b>Protéines totales (mg)</b>	<b>Activité totale (U)</b>	<b>Activité spécifique (U/mg)</b>	<b>Facteur de purification</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>Homogénat initial</b>	600	6000			
<b>Surnageant</b>	150	3750			
<b>Fraction 20-50% sat. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	40	2500			
<b>Chromatographie d'échange ionique</b>	8	2000			

## **Exercice 2**

Purification et caractérisation d'une enzyme bactérienne E sécrétée par *Bacillus halodurans*. L'enzyme E est purifiée à partir du surnageant de culture débarrassé des bactéries par centrifugation selon un protocole contenant trois étapes (Table 1). Le surnageant de culture centrifugé est 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 1 M NaCl dans le tampon A. Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées, concentrées et chargées sur une colonne de séphadex G50 équilibrée en tampon A (chromatographie d'exclusion). L'élution des protéines est réalisée avec le tampon A. 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).

Etapes		Activité enzymatique totale (U)	Quantité de protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Surageant centrifugé	culture	1413	673			
Précipitation d'ammonium	sulfate	1215	308			
Chromatographie échangeuse d'anions		438	17,4			
Chromatographie d'exclusion		342	10			

Figure 2 : Analyse des étapes de purification par électrophorèse en conditions dénaturantes.



- 1- Rédigez une fiche technique résumant les différentes étapes du protocole.
- 2- Compléter la table 1. Quels commentaires à propos de l'efficacité des différentes étapes pouvez-vous faire ?
- 3- Analyser la figure 2. Quelle information avez-vous concernant la masse molaire de l'enzyme ?

**Exercice 1 :**

Le tableau suivant sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Interpréter les résultats.

<b>Étape</b>	<b>Protéines totales (mg)</b>	<b>Activité totale (U)</b>	<b>Activité spécifique (U/mg)</b>	<b>Facteur de purification</b>	<b>Rendement (%)</b>
<b>Homogénat initial</b>	600	6000	10.0	1	100
<b>Surnageant</b>	150	3750	25.0	2.5	62.5
<b>Fraction 20-50% sat. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	40	2500	62.5	2.5	67
<b>Chromatographie d'échange ionique</b>	8	2000	250.0	4.0	80

Etapes		Activité enzymatique totale (U)	Quantité de protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Surnageant centrifugé	culture	1413	673	2,1	–	–
Précipitation d'ammonium	sulfate	1215	308	3,95	1,9	85,9
Chromatographie échangeuse d'anions		438	17,4	25,17	6,37 (12)	36,05 (31)
Chromatographie d'exclusion		342	10	34,2	1,36 (16,29)	78,08 (24,2)

1- On observe donc qu'au final l'enzyme a été purifiée environ 16 fois avec un rendement global de 24,2%.

Lorsqu'on s'intéresse à chaque étape, on observe que la chromatographie échangeuse d'anions est celle qui a la meilleure efficacité en terme de purification, mais la moins bonne efficacité en terme de rendement. Inversement la précipitation au sulfate d'ammonium et la chromatographie d'exclusion permettent un bon rendement de purification mais présentent une moins bonne efficacité de purification.

2- La figure 2 est une analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes des protéines contenues dans les fractions à différents stades de la purification. La ligne M correspond au dépôt de protéines de référence de masse molaire connue. Cette piste permet d'établir la relation entre la masse molaire et la distance de migration. La ligne 1 est une analyse du contenu protéique du surnageant de culture. On distingue de nombreuses bandes comprises entre 116 et 25 kDa. La ligne 2 est une analyse des protéines récupérées après la précipitation au sulfate d'ammonium. On distingue encore de nombreuses bandes avec néanmoins un enrichissement au niveau de 66 kDa et de 25 kDa. La ligne 3 correspond à la fraction obtenue après la chromatographie échangeuse d'anions. On observe deux bandes protéiques principales à 66 kDa et à 25 kDa. La ligne 4 correspond à la fraction obtenue après gel filtration et ne fait apparaître qu'une bande principale à 66 kDa. En accord avec le tableau de purification, l'électrophorèse montre qu'on élimine plusieurs protéines contaminantes au cours du protocole de purification pour ne conserver que la protéine d'intérêt dont la masse molaire est aux alentours de 66 000 g/mol.