

Exercice 1 : Etude biochimique des invertases (15 / 40 points)

Michaelis et Menten, dès 1913, décident de mener leurs célèbres investigations sur les enzymes à partir de travaux portant sur les invertases. Ces enzymes existent sous plusieurs formes (acide, neutre, alcaline) avec plusieurs localisations cellulaires (cytoplasme, vacuole, paroi).

L'invertase catalyse la réaction d'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. Trois isoformes d'invertase ont été isolées chez la pomme de terre : une invertase soluble cytoplasmique (INV 1), une invertase liée par liaison ionique à la paroi (INV 2) et une invertase liée par liaison covalente à la paroi (INV 3).

1) La purification des invertases : le cas des invertases cytoplasmique (INV 1) et pariétale ionique (INV 2). Les différentes étapes sont résumées dans le tableau ci-dessous. Chaque fraction protéique a été testée en présence de saccharose pour déterminer son activité catalytique en unité enzymatique. La teneur en protéine (en mg) de chaque fraction a également été dosée à l'aide de la méthode de Bradford.

1-1) Pour chaque fraction, déterminez l'activité spécifique, le taux de purification et le rendement et cela pour les deux types d'invertase. Détaillez un exemple de calcul uniquement pour chaque paramètre et remplissez le tableau 1.

1-2) Que pouvez-vous en déduire pour chaque étape de ce protocole de purification ?

Étapes de purification	Type d'invertases	Unités enzymatique (μ katal)	Quantité de protéine (mg)	Activité spécifique	taux de purification	Rendement (%)
Broyage et solubilisation	INV 1	1000	1250		1,00	100,00
	INV 2	318	353		1,00	100,00
Centrifugation à 27 000 g	INV 1	600	1034			
	INV 2	210	344			
Saturation avec du sulfate d'ammonium	INV 1	570	792			
	INV 2	180	265			
Centrifugation à 27 000 g	INV 1	530	730			
	INV 2	172	215			
Chromatographie gel filtration sur sephadex G-100	INV 1	320	5,82			
	INV 2	90	3,10			
Chromatographie d'adsorption	INV 1	208	1,30			
	INV 2	62	0,50			