

**Question 1 (6 points) :**

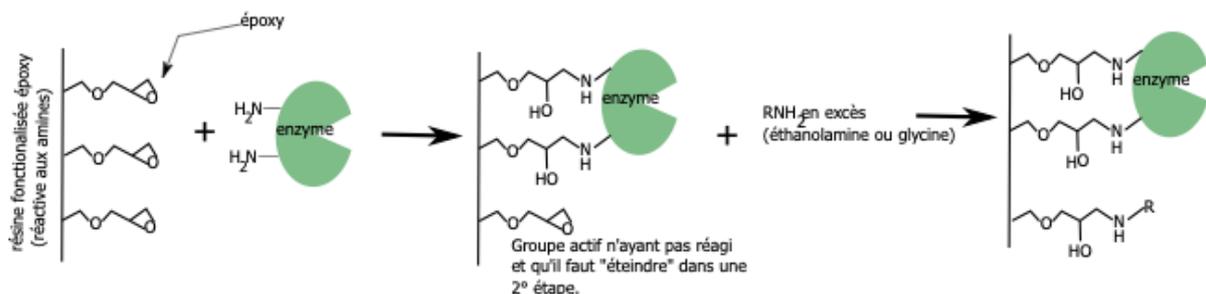
On étudie la fixation à la fructose 1-6 diphosphate aldolase d'une part du sulfate, d'autre part de l'hexitol diphosphate. Les résultats des deux expériences sont compilés dans le tableau suivant.

Sulfate libre (mM)	0,1	0,2	0,5	1	2	5
Nb de ligands fixés	1	1,8	3,1	4,1	4,9	5,5
Hexitol diphosphate ( $\mu$ M)	0,2	0,5	1	2	5	10
Nb de ligands fixés	0,4	0,9	1,35	1,9	2,4	2,7

A l'aide de la représentation de Scatchard, déterminer :

- Le nombre de site de fixation ?
- Constantes de dissociation.

**Question 2 (4 points) :** Des résines poreuses (à base de plastiques proche des polyméthacrylates) fonctionnalisées avec des groupements oxirane sont utilisées pour l'attachement de pénicilline amidases. Les enzymes immobilisées restent active et sont très stables. Différentes pénicillines amidases sont utilisées ainsi immobilisées depuis de nombreuses années pour produire industriellement de façon semi-synthétique les antibiotiques bêta-lactames ampicilline et amoxicilline.



- 1- La technique d'immobilisation utilisée.
- 2- Le principe de cette technique

**Question 3 (10 points) :** L'acétylcholinestérase est une enzyme catalysant l'hydrolyse :



La détermination de son activité catalytique peut se faire de la façon suivante : un volume de solution d'enzymes contenant x mg de protéine est ajouté à une solution d'acétylcholine (en excès). On amène le pH initial à 7 et la température à 30°C. Le pH a tendance à diminuer à cause de l'acide libéré ; on détermine donc le volume V en cm<sup>3</sup> de solution d'hydroxyde de sodium exactement 0,01mol.dm<sup>-3</sup> nécessaire, par minute, pour maintenir le pH à sa valeur initiale. On compare 2 techniques de purification de cette enzyme à partir d'un broyat de tissus animal.

Fraction	Masse totale de protéines contenues dans la fraction : mg	Masse x utilisé pour l'essai : mg	Volume V mesurée lors de l'essai : cm <sup>3</sup> NaOH (0,01mol.dm <sup>3</sup> par min)	Activité catalytique spécifique : U.mg <sup>-1</sup>	Activité catalytique totale : U	Rendement %	Enrichissement
<b>1<sup>ère</sup> technique : utilisation de procédés classiques</b>							
I <sub>1</sub> : tissus frais homogénéisé on précipite par (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	120	0,1	5,20				
II <sub>1</sub> : fraction I soumise à une chromatographie sur DEAE-cellulose	14	0,01	2,30				
III <sub>1</sub> : concentration et dialyse	13	0,01	2,40				
IV <sub>1</sub> : gel-filtration sur Séphadex G200	6,5	0,01	4,20				
V <sub>1</sub> : Fraction passé sur DEAE-cellulose	1,3	0,01	7,90				
<b>2<sup>ème</sup> technique : utilisation de la chromatographie</b>							
I <sub>2</sub> : tissus frais homogénéisé On précipite par (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> redissolution du culot	140	0,1	4,7				
II <sub>2</sub> : fraction I <sub>2</sub> soumise à une chromatographie d'affinité	4,7	0,01	9,75				

- Compléter numériquement le tableau en faisant figurer pour chaque fraction :
  - L'activité catalytique spécifique en U.mg<sup>-1</sup>
  - L'activité catalytique totale de la fraction ;
  - Le rendement (pourcentage de récupération de l'activité par rapport à la première étape) -l'enrichissement (coefficient de purification par rapport à la première étape). N.B : 1 unité U correspond à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions du dosage, convertit 1µmol d'acétylcholine par min.
- Comparer les résultats obtenus dans les deux techniques.