

**Exercice 1 (8 points) :** La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire contenue dans la plupart des tissus (myocarde, foie, rein, cerveau et muscle strié). La mesure de cette activité s'effectue en suivant l'oxydation du NADH,H<sup>+</sup>. Cette réaction est catalysée par la LDH qui consomme du NADH,H<sup>+</sup> en présence de pyruvate et abouti à la formation de NAD<sup>+</sup> et de lactate. L'objectif de ce travail est purifier une protéine, en l'occurrence la LDH à partir d'un extrait de tissu bovin fœtal au moyen d'une chromatographie d'affinité sur bleu Cibacron. Le volume réactionnel total est de 2 ml et tous les substrats de la réaction sont en concentration saturante pour l'enzyme. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans cuve 2 cm de trajet optique.

**Question 1 :** La mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut est effectuée à partir d'une prise d'essai contenant 0,1 mg de protéines totales. Après 5 min d'incubation, la variation d'absorbance du mélange lue à 340 nm est 0,300. La valeur du coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm est de 6300 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

- A- Donner le principe de la détermination de l'activité enzymatique.
- B- Calculer la concentration catalytique de la LDH dans la cuve réactionnelle.
- C- Calculer l'activité spécifique de la LDH dans l'extrait brut.

**Question 2 :** La première étape de purification est une chromatographie d'affinité bleu Cibacron. Elle permet d'obtenir un éluat B contenant l'activité LDH. La mesure de l'activité enzymatique de l'éluat B est effectuée à partir d'une prise d'essai contenant 1. 10<sup>-3</sup> mg de protéines totales. La variation de l'absorbance lue à 340 nm pendant 60 secondes d'incubation est de 0,358. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans cuve 2 cm de trajet optique. L'eluat B est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes. Une seule bande est observée de masse moléculaire apparente

- A- Calculer le degré de purification de la LDH par l'etape de chromatographie d'affinité bleu Cibacron.
- B- Quel est le rôle de bleu Cibacron lors de la chromatographie d'affinité
- C- Calculer l'activité moléculaire spécifique de la LDH.

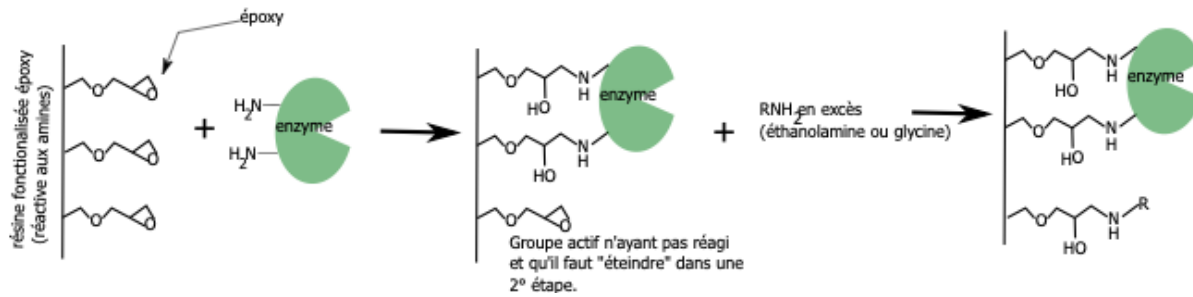
**Exercice 2 (8 points) :**

L'adénylate kinase (27 500 Da) permet de convertir l'AMP en ADP par transfert d'un résidu phosphorylé de l'ATP. La stœchiométrie de fixation de l'AMP est étudiée par dialyse à l'équilibre en absence d'ATP. On a mis d'un côté de la membrane 40 ml de tampon contenant 80 mg d'enzyme, de l'autre 40 ml d'AMP à différentes concentrations. A l'équilibre, on prélève 25 ml dans chacun des 2 compartiments pour y mesurer la concentration en AMP.

[AMP] dans le compartiment avec enzyme (µM)	10,5	44	70	120	212	280
[AMP] dans le compartiment sans enzyme (µM)	4	20	36	74	156	220

*Déterminer la constante de dissociation des sites de fixation de l'AMP et leur nombre.*

**Exercice 3 (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 actives 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