Exercice 1 (12 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⁺. Cette réaction est catalysée par la LDH qui consomme du NADH,H⁺ en présence de pyruvate et abouti à la formation de NAD⁺ 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 foetal 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 $1 \cdot 10^{-3}$ 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 $6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

- A- Donner le principe de la détermination de l'activité enzymatique (1 points).
- B- Calculer la concentration catalytique de la LDH dans la cuve réactionnelle (2 points).
- C- Calculer l'activité spécifique de la LDH dans l'extrait brut (2 points).

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 $1 \cdot 10^{-3}$ 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'éluat 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'étape de chromatographie d'affinité bleu Cibacron (2 points).
- B- Quel est le rôle de bleu Cibacron lors de la chromatographie d'affinité (2 points).
- C- Calculer l'activité moléculaire spécifique de la LDH (3 points).

Exercice 2 (8 points) : 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 (1s point) et remplissez le tableau 1 (3 points).

1-2) Que pouvez-vous en déduire pour chaque étape de ce protocole de purification (4 points) ?

Tableau1.

Étapes de purification	Type d'invertases	Unités enzymatique (μkatal)	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			