**Université de Bejaia - Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département : Biologie Physico-Chimique - EMD TAB- L3 GFA 2022-2023**

**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’objective 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 1. 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 M-1.cm-1

1. Donner le principe de la détermination de l’activité enzymatique (**1 points).**
2. Calculer la concentration catalytique de la LDH dans la cuve réactionnelle **(2 points).**
3. 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. 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’eluat B est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes. Une seule bande est observée de masse moléculaire apparente

1. Calculer le degré de purification de la LDH par l’étape de chromatographie d’affinité bleu Cibacron **(2 points).**
2. Quel est le rôle de bleu Cibacron lors de la chromatographie d’affinité **(2 points).**
3. Calculer l’activité moléculaire spécifique de la LDH (**3 points).**

**1-A)**

pyruvate + NADH,H+  → lactate + NAD+. **(0,5**)

L’activité de l’enzyme est déterminée par la mesure en conditions optimales, de la cinétique

de disparition à 340 nm du NADPH. Dans les conditions expérimentales, la diminution d’absorbance liée au NADH mesurée au spectrophotomètre est directement proportionnelle à l’activité de la LDH. **(0,5**)

**1-B**)

a) vitesse initiale = Δ (NADH)/ Δt = (0,300/(5 x 2)) x 106/6300 = 4,76 μmol.L-1 .min-1 **(**0,5)

soit une concentration catalytique de **4,76 U/L. (**0,5)

b) cette activité correspond à un ajout de 0,1 mg de protéines totales pour 2 mL ou 50 mg pour 1 L

Donc activité spécifique de A= 4,76 /0,05 = **95 U/g (**1)

**1-C)**

Concentration catalytique de B = (0,358/2) x 106/6300 = **28,4 U/L (**1)

- Cette activité correspond à un ajout de 1 μg de protéines totales pour 2 mL ou 500 μg pour 1 L

Donc activité spécifique de B = 28,4 / 500. 10-6 = 56800 U/g **(**1)

**2-A)**

Le degré de purification = 56800/ 95 = 598 **(**2)

**2-B)**

Le bleu Cibacron à une structure proche du NAD qui est un cofacteur de la réaction impliquant la LDH **(1**) . C’est la chromatographie la plus sélective puisqu’il y a complémentarité entre ligand (bleu Cibacron) et la protéine (LDH). **(1**)

**2-C)**

 L’éluat B est apparemment pur. Son activité spécifique exprime donc Vmax rapportée

à 1 g/L d’enzyme.

On en déduit :

Activité moléculaire spécifique = 56800.10 -6 /1/45000 = 2558 min- 1 **(**3)

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

