

Exercice 3 :

On se propose de purifier la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) à partir d'un extrait brut A de B. subtilis. Pour tester le degré de purification après chaque étape, on détermine l'activité spécifique. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans une cuve de 2 cm de trajet optique. Le volume réactionnel total est de 2 mL et tous les substrats de la réaction sont en concentration saturante pour l'enzyme.

NB : vos résultats seront exprimés en prenant comme unités : le litre, le gramme, la minute et pour les quantités catalytiques l'unité U. La valeur du coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm est de 6300 M⁻¹.cm⁻¹

Question 1 : écrire la réaction catalysée par la G6PDH et donner le principe de la détermination de l'activité enzymatique. La mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut A est effectuée à partir d'une prise d'essai contenant 0,1 mg de protéines totales. La variation d'absorbance lue à 340 nm pendant 5 min d'incubation est de 0,300.

Question 2 :

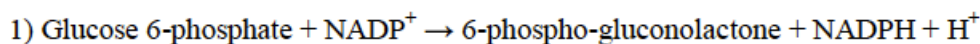
- calculer la concentration catalytique de la G6PDH dans la cuve réactionnelle.
- en déduire l'activité spécifique de la G6PDH dans l'extrait brut A.

La 1ère étape de purification est une chromatographie d'affinité sur une phase stationnaire greffée par du glucose 6-phosphate. Elle permet d'obtenir un éluat B contenant l'activité G6PDH. La mesure de l'activité enzymatique de l'éluat B est effectuée sur une prise d'essai contenant 1µg de protéines totales. La variation d'absorbance lue à 340 nm pendant 1 min d'incubation est de 0,358 dans le même type de cuve.

Question 3 : calculer le degré de purification de la G6PDH par l'étape de chromatographie d'affinité. L'éluat B est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et de mercaptoéthanol. Après migration et révélation une seule bande est observée de masse moléculaire apparente 80 kDa. L'analyse de l'éluat B en conditions non dénaturantes par chromatographie d'exclusion sur gel se traduit par la présence d'un seul pic de masse moléculaire apparente 320 kDa.

Question 4 :

- quels sont les rôles du SDS et du mercaptoéthanol lors de l'électrophorèse ?
- interpréter les résultats de ces 2 analyses.
- calculer l'activité moléculaire spécifique de la G6PDH.



L'activité de l'enzyme est déterminée par la mesure en conditions optimales, de la cinétique d'apparition à 340 nm du NADPH produit.

2)

a) vitesse initiale =
$$\frac{\Delta(\text{NADPH})}{\Delta t} = \frac{0,300}{5 \times 2} \times \frac{10^6}{6300} = 4,76 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$$
 soit une concentration catalytique de 4,76 U/L.

- 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 =
$$\frac{4,76}{0,05} = 95 \text{ U/g}$$

3)

3)

- concentration catalytique de B = $\frac{0,358}{2} \times \frac{10^6}{6300} = 28,4 \text{ U/L}$

- 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 = $\frac{28,4}{500 \cdot 10^{-6}} = 56800 \text{ U/g}$

- degré de purification = $\frac{56800}{95} = 598$

4)

a) - SDS : détergent anionique confère approximativement à toutes les holoprotéines une charge négative et un même rapport charge/masse (il permet aussi de linéariser les protéines).

- le mercaptoéthanol coupe les ponts disulfures inter et intra chaînes. En cela il dissocie les sous-unités reliées par des ponts S-S et complète la linéarisation (amorcée par le SDS) des sous unités possédant des ponts S-S intra chaînes.

b) En conséquence la protéine native de masse moléculaire 320 kDa (chromato d'exclusion en conditions non dénaturantes) est probablement un tétramère constitué de 4 sous-unités identiques de 80 kDa (électrophorèse en conditions dénaturantes : SDS, mercaptoéthanol) sans que l'on puisse préciser leur mode d'association.

Il est conseillé de porter à ébullition le mélange protéine-SDS-mercaptoéthanol avant dépôt sur le gel d'électrophorèse pour l'efficacité du SDS et du mercaptoéthanol et donc une meilleure séparation des protéines.

c) L'éluat **B** est apparemment pur. Son activité spécifique exprime donc V_{\max} rapportée à 1 g/L d'enzyme. On en déduit :

$$\text{activité moléculaire spécifique} = \frac{56800 \cdot 10^{-6}}{1} = 18176 \text{ min}^{-1}$$