

## TD n°2 Purification des enzymes

### Exercice n°1:

10 $\mu$ L de l'extrait uréasique produisent en une minute 3  $\mu$ moles d'ammoniac à pH 7 et à 30°C.

1-Quelle est l'activité en mol/s de 1mL d'extrait uréasique ?

2-Quelle est l'activité spécifique (en moles de substrat/s.mg) si l'extrait contient 7mg de protéines par mL ?

3-On purifie l'extrait par chromatographie pour éliminer certaines protéines non enzymatique. Les protéines récupérées se retrouvent dans une solution à 24 mg de protéine par mL de solution. 10 $\mu$ L de cette nouvelle solution transforment 26  $\mu$ moles de substrats en 4 secondes. Quelle est l'activité spécifique de cette nouvelle solution enzymatique (en moles de substrat/s.mg) ?

4-On poursuit la purification par 2 nouvelles chromatographies d'échange d'ions.

On obtient une préparation à 28mg de protéines par mL; 10 $\mu$ L de cette solution transforment 30 $\mu$ moles de substrat en 2 secondes.

Quelle est l'activité spécifique en mol/s.mg ?

5-Une dernière chromatographie donne une solution à 41mg de protéines par mL; 10 $\mu$ L de cette solution transforment 22 $\mu$ moles de substrat en une seconde.

Quelle est l'activité spécifique en mol/s.mg ?

Conclure.

### Exercice n°2 :

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 (voir tableau)

1-Technique : utilisation de procédés classiques ;

2-Technique : utilisation de la chromatographie d'affinité

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				

1- Compléter numériquement le tableau en faisant figurer pour chaque fraction :

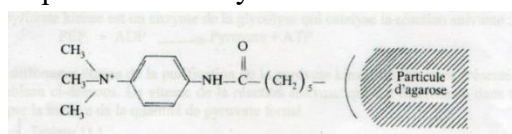
- l'activité catalytique spécifique en U.mg<sup>-1</sup>
- l'activité catalytique totale de la fraction ;
- le rendement (pourcentage de récupération de l'activité par rapport à la première étape)
- l'enrichissement (coefficient de purification par rapport à la première étape).

**N.B** : 1 unité U correspond à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions du dosage, convertit 1µmol d'acétylcholine par min.

2- Comparer les résultats obtenus dans les deux techniques.

3- Donner le principe de la chromatographie sur DEAE-cellulose utilisée dans la première technique.

4- La chromatographie d'affinité employée dans la 2<sup>ème</sup> technique est une chromatographie sur colonne. La colonne est constituée par des particules d'agarose où sont fixées, de façon covalente, des molécules d'un inhibiteur compétitif de l'acétylcholinestérase :



L'enzyme à isoler se lie par l'intermédiaire de son site actif et on doit l'éluer par une solution contenant la molécule de ligand libre (inhibiteur compétitif). Justifier les résultats obtenus avec la 2<sup>ème</sup> technique de purification.