

EPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION 2008-2009 ZONE NORD

Enoncé :

L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) est purifiée à partir d'un homogénat de torpille électrique. A chaque étape de la purification, on dose la concentration catalytique (U/mL) et la concentration en protéines totales. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

| Etape de purification | Volume (mL) | protéines (mg/mL) | concentration catalytique (U/mL) |
|---|-------------|-------------------|----------------------------------|
| Homogénat | 150 | 600 | 12 |
| précipitation par (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10 | 300 | 150 |
| Affinité (éluat) | 20 | 6 | 51 |

Questions

1 - Calculer l'activité spécifique de chaque fraction, ainsi que les rendements et degrés de purification pour l'ensemble de la purification.

Le Km de l'enzyme pour son substrat est de 0,30 mM. Pour mesurer les concentrations catalytiques du tableau ci-dessus, chaque fraction est préalablement diluée au 1/1000^{ème}, le temps de mesure est de 1 min et les conditions du dosage (dans les conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité d'activité enzymatique) sont telles que

90 % des sites actifs de l'enzyme $\left[\frac{(ES)}{(E)_t} = 0,9 \right]$ sont occupés par le substrat acétylcholine.

2 – Quelle doit être la concentration en acétylcholine (en mM et en unités Km) dans les conditions du dosage?

3 –

- Calculer pour la 2^{ème} étape de purification (précipitation par (NH₄)₂SO₄ la vitesse initiale (v₀) mesurée dans le milieu réactionnel. Quelle serait la Vmax ?
- En déduire, après 1 min d'incubation, la concentration résiduelle en substrat (en mmol/L et en unités Km).
- Calculer la vitesse (v) correspondant à cette concentration et l'exprimer en % de la vitesse initiale (v₀) mesurée. Commenter.