

## Thème 4 – Chapitre 1 – Activité 2

### EXTRACTION ET ANALYSE DE L'HEXOKINASE DE SACCHAROMYCES CEREVIAE

Eléments de réponse

#### ANALYSE DES RÉSULTATS

1.1.

Cela permet de faciliter la lyse alcaline de la membrane de *Saccharomyces cerevisiae* afin de libérer son contenu cytoplasmique tout en laissant les molécules dans leur état natif.

1.2.

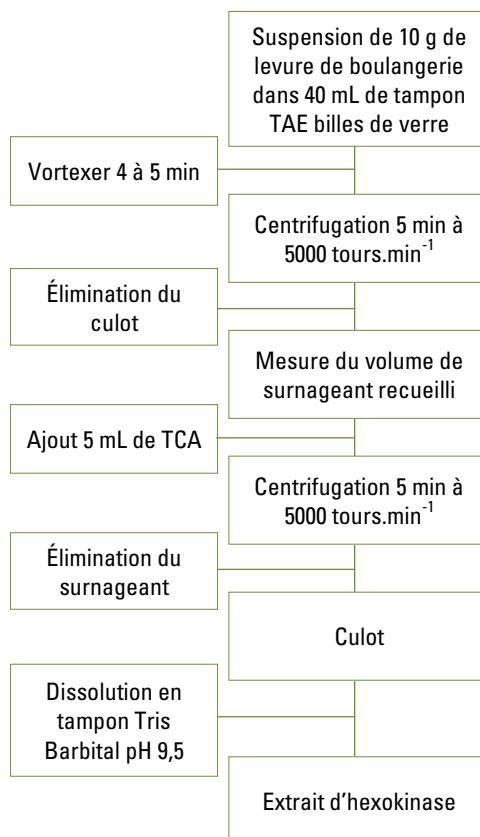
La centrifugation sert à séparer deux phases :

- la phase solide (culot) contenant les débris cellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* ;
- la phase liquide (surnageant) contenant les molécules solubles telles que l'hexokinase.

1.3.

Afin d'éviter la dénaturation thermique des enzymes par la chaleur et plus précisément celle de l'hexokinase.

2.1.



2.2.

Cette première centrifugation permet de recueillir le surnageant de la lyse mécanique contenant les molécules solubles telles que l'hexokinase.

2.3.

Le culot de la deuxième centrifugation contient le précipité protéique obtenu par action du TCA. Or l'hexokinase est une enzyme de nature protéique.

## 3.1.

D'après la composition des tubes de gamme, la quantité en protéines de la gamme va de 0 à 30 µg par tube. Puisque les essais doivent être situés en milieu de gamme, ils doivent contenir environ 15 µg de protéines sous un volume de 0,02 ou 0,04 mL de surnageant d'extraction dilué.

Calcul de la concentration massique en protéines du surnageant d'extraction dilué :

$$\begin{aligned} t_{\text{surnageant d'extraction dilué}} &= \text{masse en protéines du tube} / \text{volume de surnageant} \\ &= 15 / 0,04 \\ &= 375 \text{ µg.mL}^{-1} \text{ soit } 0,375 \text{ g.L}^{-1}. \end{aligned}$$

Or la teneur moyenne en protéine des extraits protéiques est de 2,5 g.L<sup>-1</sup> donc une dilution est nécessaire :

$$d = t_{\text{protéines finale}} / t_{\text{protéines initiale}} = 0,375 / 2,5 \approx 1/6$$

Préparation des dilutions :

$$\begin{aligned} \text{Volume d'extrait à prélever} &= \text{volume total de dilution} \times d \\ &= 10 \times (1 / 6) \\ &= 1,7 \text{ mL soit } 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

Matériel : pipette jaugée de 2 mL et fiole jaugée de 10 mL.

Remarque : les dilutions sont à faire en eau physiologique afin de garder l'hexokinase à l'état natif.

## 3.2.

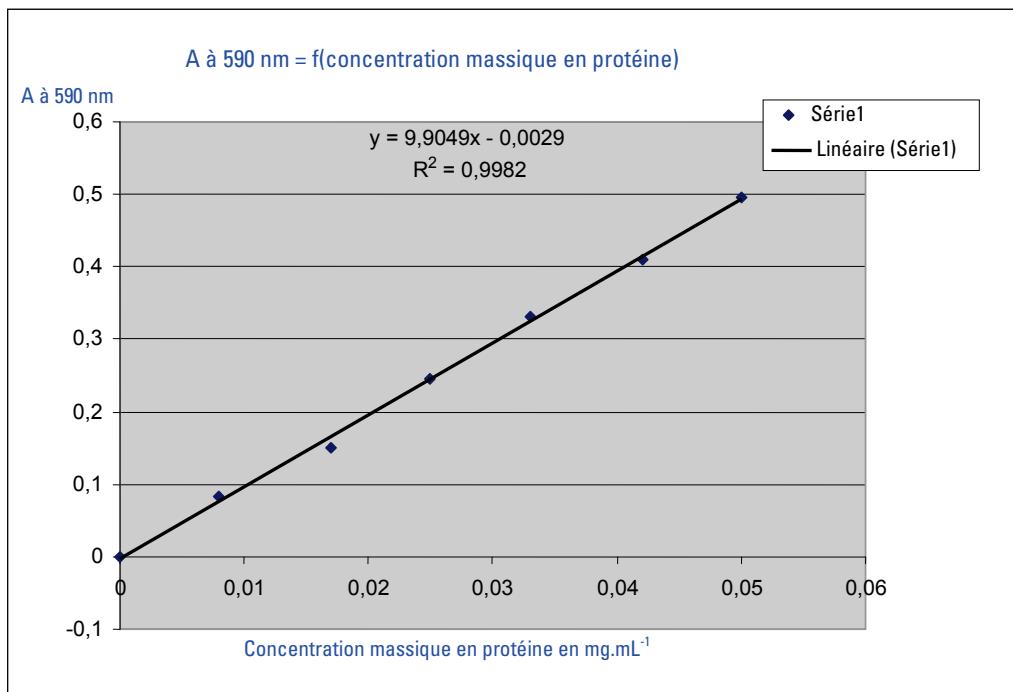
$$t_{\text{protéine de la cupule}} = (t_{\text{protéines de la solution étalon}} \times V_{\text{solution étalon}}) / V_{\text{total de la cupule}}$$

Exemple sur la cupule 4 :

$$t_{\text{protéine de la cupule 4}} = (0,5 \times 0,01) / 0,6 = 0,025 \text{ mg.mL}^{-1}.$$

Cupule	1	2	3	4	5	6	7
Solution étalon de protéine (mL)	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
t <sub>protéine de la cupule</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	0	0,008	0,017	0,025	0,033	0,042	0,050

## 3.3.



Équation de la droite :

$$A_{590 \text{ nm}} = 9,9049 t_{\text{protéine}} - 0,0029$$

Analyse des extraits :

$$t_{\text{protéine de la cupule}} (\text{mg.mL}^{-1}) = (A_{590\text{nm}} + 0,0029) / 9,9049$$

$$t_{\text{protéine de l'extrait}} (\text{mg.mL}^{-1}) = t_{\text{protéine de la cupule}} \times (V_{\text{total de la cupule}} / V_{\text{extrait dilué}}) \times K \text{ (facteur de dilution des extraits)}$$

Extrait par lyse alcaline :

$$t_{\text{protéine de la cupule E1}} = (0,175 + 0,0029) / 9,9049 = 0,01796 \text{ mg.mL}^{-1}$$

$$t_{\text{protéine de l'extrait}} = 0,01796 \times (0,6 / 0,02) \times 6 = 3,2328 \text{ mg.mL}^{-1}$$

Extrait	E1	E2	E'1	E'2
$t_{\text{protéine de la cupule}} (\text{mg.mL}^{-1})$	0,01796	0,03321	0,02654	0,05451
$t_{\text{protéine de l'extrait}} (\text{mg.mL}^{-1})$	3,2328	2,9889	4,7772	4,9059

### 3.4.

Extrait	E1	E2	E'1	E'2
$t_{\text{protéine de l'extrait}} (\text{mg.mL}^{-1})$	3,2328	2,9889	4,7772	4,9059
2,8 Sr ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	0,28		0,28	
$t (\text{mg.mL}^{-1})$	0,2439		0,1287	
L'ensemble des résultats ont été obtenu en condition de répétabilité donc la moyenne est retenue.				
$t_{\text{protéine de l'extrait}} (\text{mg.mL}^{-1})$	3,1 ( $\pm 0,1$ )		4,8 ( $\pm 0,1$ )	

### 4.1.

Dans les conditions dénaturantes, les deux monomères de l'hexokinase seront séparés et le SDS permet une migration des monomères uniquement basée sur leur poids moléculaire car ils seront tous les deux sous forme anionique.

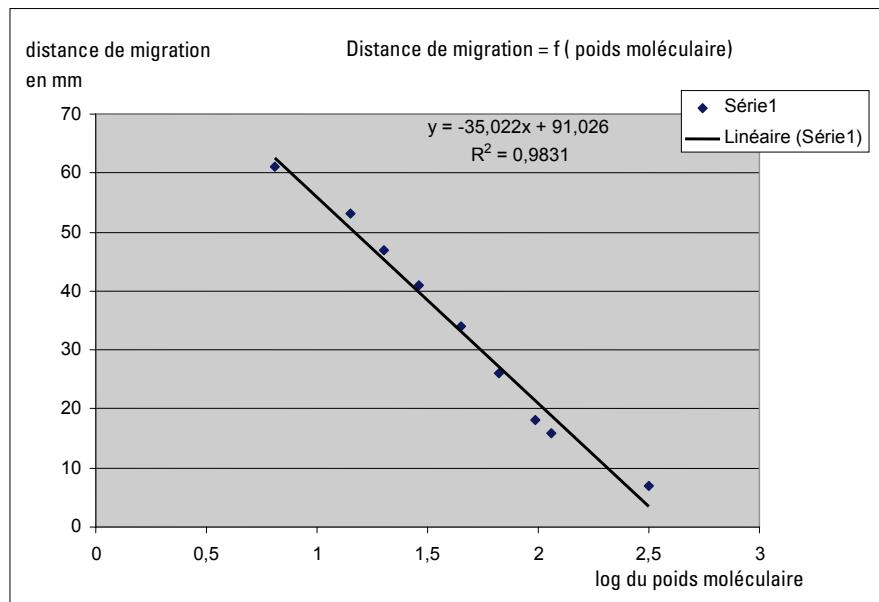
### 4.2.

Le dimère homogène de l'hexokinase est de 100 000 Daltons donc chaque monomère doit faire environ 50 000 Daltons soit 50 kDa. Le marqueur de poids moléculaire bas ou intermédiaire convient mais le plus adapté est l'intermédiaire car il permet de voir les dimères d'hexokinase mal séparés de 100 KDa.

### 4.3.

Cela permet de récupérer l'hexokinase native à partir du gel.

## 4.4.



## 4.5.

Plus le log du poids moléculaire augmente plus la distance de migration dans le gel est faible.

## 4.6.

L'extrait par lyse alcaline présente deux bandes donc deux types de protéine tandis qu'avec le choc mécanique, on n'obtient qu'une seule bande donc une seule protéine. La purification par choc mécanique est de meilleure qualité que celle par lyse alcaline.

## 4.7.

Pour l'extrait par lyse alcaline, il s'agit de la bande la plus haute et la plus dense dans le gel.  
Distance de migration pratique = 31 mm.

## 4.8.

Le report de la bande de 31 mm, sur la droite, permet d'obtenir un log de poids moléculaire de 1,71 soit un poids moléculaire de 51,286 KDa.

## 4.9.

$$\text{IR} = (51,286 - 53,942) / 53,942 \times 100 = 4,9 \%$$

Le poids moléculaire déterminé est acceptable car l'IR obtenue est inférieure à 5 %.

## 4.10.

Le marqueur de poids moléculaires peut être le même mais celui pour poids moléculaires élevés est plus approprié.

## 5.1.

	Teneur en protéine (mg.mL <sup>-1</sup> )	Poids moléculaire des monomères (g.mol <sup>-1</sup> )	IR (%)	Pureté des extraits
Extraction basique	3,1	51,286	4,9	Non pur
Extraction par choc mécanique	4,8	51,286	4,9	Pur

5.2.

L'extraction par lyse alcaline fournit des monomères ayant un poids moléculaire correct mais impurs avec une teneur protéique de  $3,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  soit  $3,1 \text{ g.L}^{-1}$ .

L'extraction par choc mécanique fournit des monomères de poids moléculaires corrects, purs avec une teneur protéique de  $4,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  soit  $4,8 \text{ g.L}^{-1}$ .

5.3.

Dans les deux extractions, les extraits ont une teneur protéique supérieure à celle annoncée de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  donc les extractions sont efficaces.

Les monomères extraits correspondent à ceux de l'hexokinase ( $\text{IR} < 5\%$ ) dans les deux extractions.

Cependant, l'extraction par choc mécanique a une pureté que ne possède pas celle par lyse alcaline. De plus le choc mécanique est une extraction plus rapide et plus facile à mettre en œuvre que celle par lyse alcaline. D'après tous ces arguments, l'extraction par choc mécanique semble la plus adaptée.