

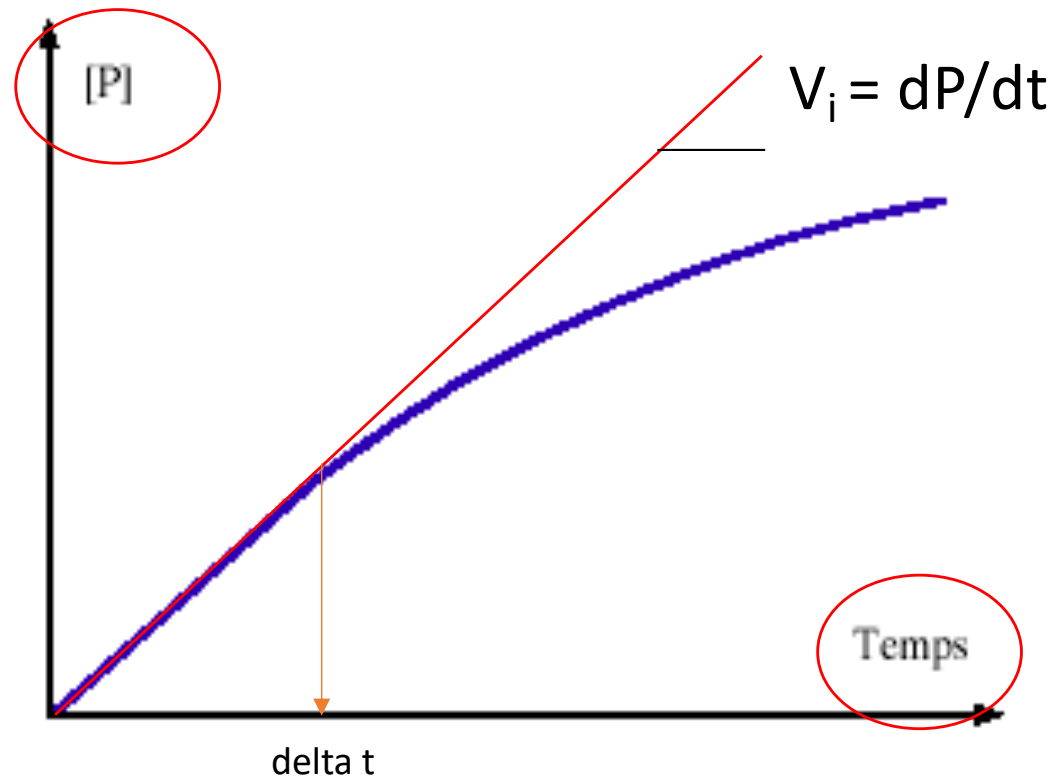
# Exercice d'enzymologie

- Je ne me dis pas que l'enzymologie, « c'est compliqué », et je prends le temps nécessaire pour comprendre et retenir cette présentation et la suivante (au moins).
- Je connais absolument les quelques formules et représentations graphiques à connaître absolument
- Je prends garde aux dilutions
- Je ne me laisse pas impressionner par des équations réactionnelles compliquées
- Je prends le temps de bien comprendre l'énoncé : enzyme(s) ? substrat(s) ? produit(s) ?  
Que mesure t'on en fonction de quoi ? Que peut-on/doit-on déterminer ? (enzyme ?  
substrat ?  $K_m$  ?  $K_{cat}$  ?...)
- J'essaye de répondre de façon cohérente (unités... ) et claire
- J'écris des phrases. Je fais mon maximum pour l'orthographe. Je respecte mon correcteur.

- **Conditions de vitesse initiale** ( $V_0, V_i$ ) :
  - Excès de substrat par rapport à l'enzyme
  - Réaction dans un seul sens
  - Début de la réaction
 + *température, pH, force ionique, cofacteurs...*
- $V_0 = K_{cat} [ES] = k_{+2} [ES]$
- $V_{max} = K_{cat} [E]_{tot} = k_{+2} [E]_{tot} \rightarrow V_{max}$  est prop à  $[E]_{tot} \rightarrow V_{max} = cste$
- $V_0 = V_{max} \cdot S / (K_m + S) \rightarrow V_0$  est aussi prop à  $[E]_{tot} \rightarrow V_0 = cste$
- Toute  $V_0$  (y compris  $V_{max}$ ) est prop à  $[E]_{tot}$ .
- $K_m = cste$  de Michaelis = concentration en substrat pour laquelle  $V_0 = V_{max}/2$ . Plus le  $K_m$  est grand, plus l'affinité de S pour E est petite, et réciproquement.
- Quand Enzyme + Substrat + « autre chose » :  $K_m$  et  $V_{max}$  **apparent(e)** ou **mesuré(e)**
- $K_{cat} = cste$  catalytique = en conditions de  $V_{max}$ , nbre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme par unité de temps
- Efficacité catalytique =  $K_{cat}/K_m$

# Mesure d'une vitesse initiale ( $V_0$ ou $V_i$ )

On a une solution d'enzyme  
On lui « donne » une concentration en substrat [S], on mesure la  $V_0$



→  $V_i$  et delta t (temps phase stationnaire)

**Pour déterminer une activité/quantité/concentration enzymatique,  
il faut mesurer une vitesse initiale  $V_0$**

*Cela peut être la  $V_{max}$  (plus pratique), mais ce n'est pas obligé...*

*Je mesure la  $V_0$  et j'en déduis la quantité/activité/concentration correspondante  
en U (U/L) ou en Katal (Katal/L)*

*Faire attention au terme « activité » ; bien regarder et tenir compte de l'unité demandée*

## Définitions U et katal !!

**1 U = quantité d'enzyme permettant de transformer/former une µmole de substrat/produit par minute.**

**1 Katal = quantité d'enzyme permettant de transformer/former une mole de substrat/produit par seconde.**

$$1 \text{ katal} = 60 \cdot 10^6 \text{ U}$$

*Formellement, 1 U ou 1 kat **ne sont pas des vitesses**...  
Ce sont des quantités d'enzyme correspondant à des vitesses...*

- Souvent : solution d'enzyme (**ou en poudre**) + tampon + cofacteurs +... (phase de préincubation) et on ajoute le substrat = réactif déclenchant.
- Et on mesure l'absorbance à une certaine l.o d'un substrat (qui diminue) ou d'un produit (qui augmente). Des fois, on mesure autre chose que l'absorbance...

- **$A = \epsilon LC$**

Absorbance de la molécule qui « absorbe » à une certaine l.o.

Concentration de la molécule qui « absorbe »

Longueur de la cuve : attention ! Pas toujours 1 cm !

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire de la molécule qui absorbe – **attention unités !!**

- **Additivité de la loi de Beer-Lambert** (les différentes absorbances s'additionnent)

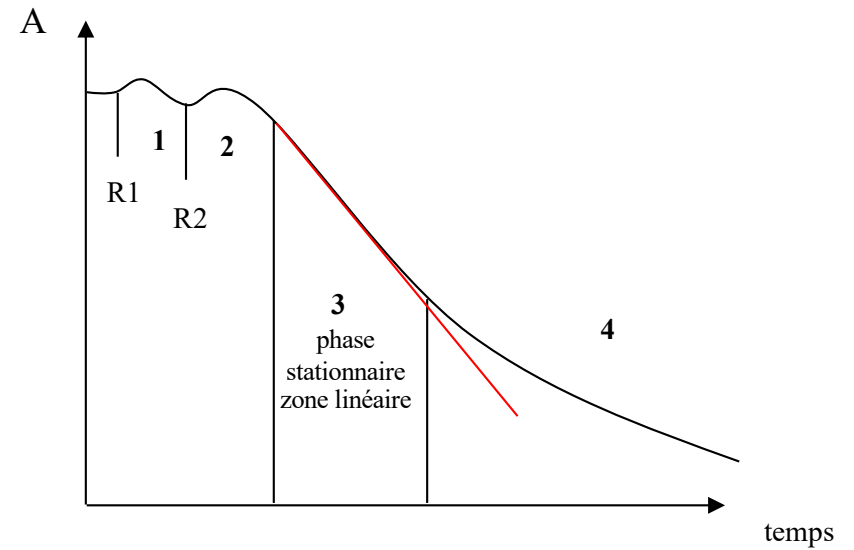
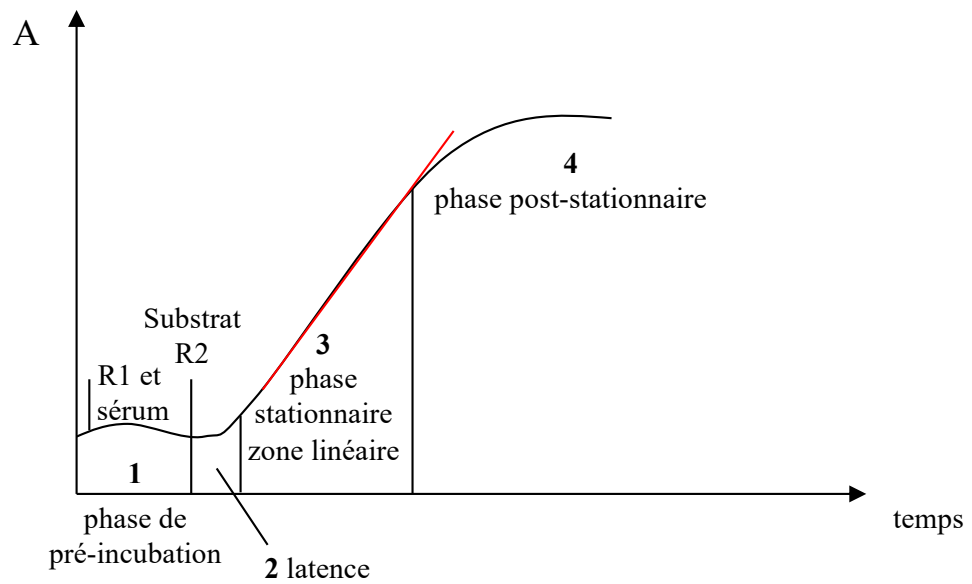
- $C = A \times 1/\epsilon L \rightarrow \Delta C/\Delta t = V_0 \text{ dans la cuve} = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon L$

- $\Delta A/\Delta t$  **dans la zone linéaire** (donc, je définis bien la zone linéaire...)

- Vous exprimez la  $V_0$  en  **$\mu\text{moles}/\text{min}/\text{L}$  (AE en U/L)** ou en  **$\text{moles}/\text{sec}/\text{L}$  (AE en Kat/L)**

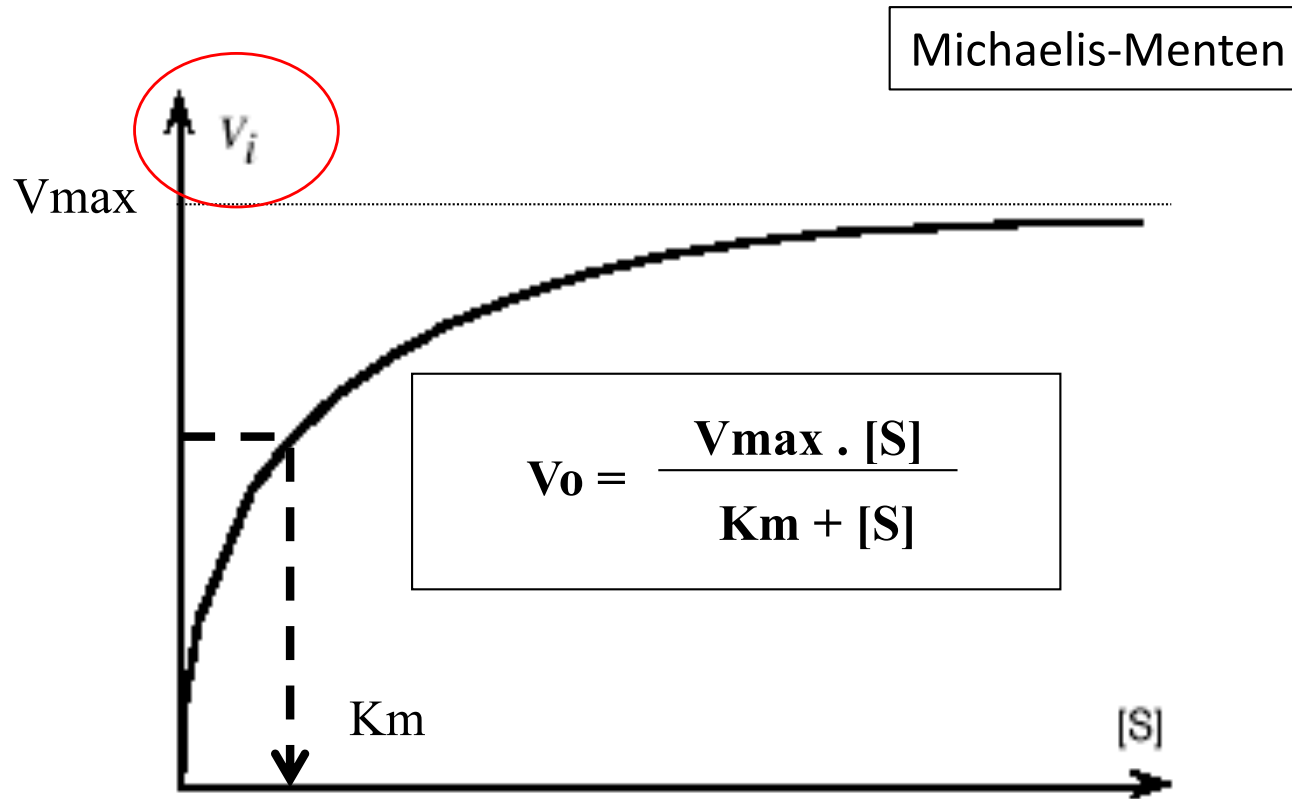
Ensuite, **multiplier par le facteur de dilution de la solution d'enzyme (>1)** =  
vol total/vol solution d'enzyme (plasma, sérum, urines, **autre**).

## Dans un automate de biochimie...



# Mesure $V_{max}$ + $K_m$

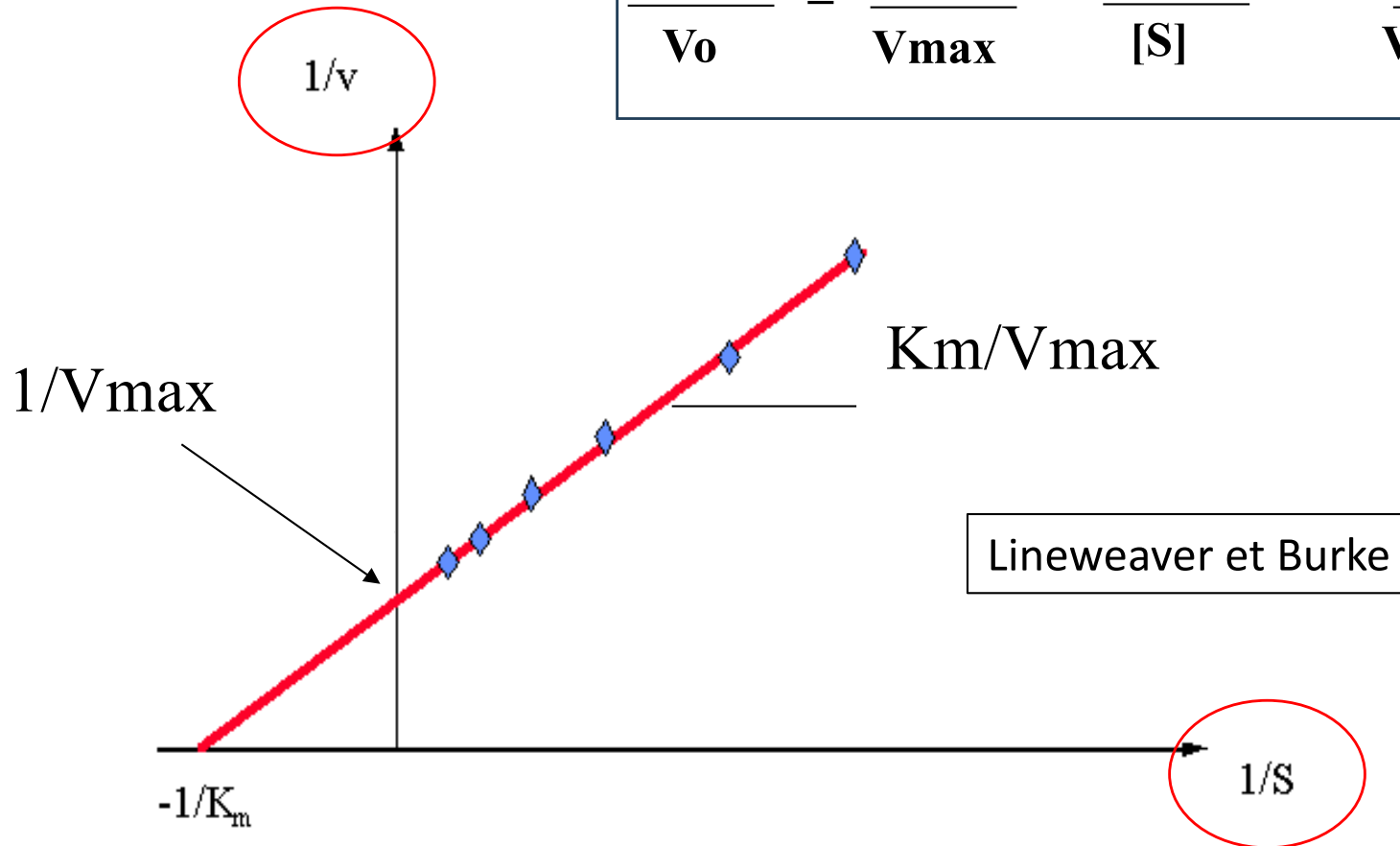
Pour une même solution d'enzyme, on mesure différentes  $V_0$  pour différentes  $[S]$



→  $V_{max}$  et  $K_m$

# Mesure Vmax + Km

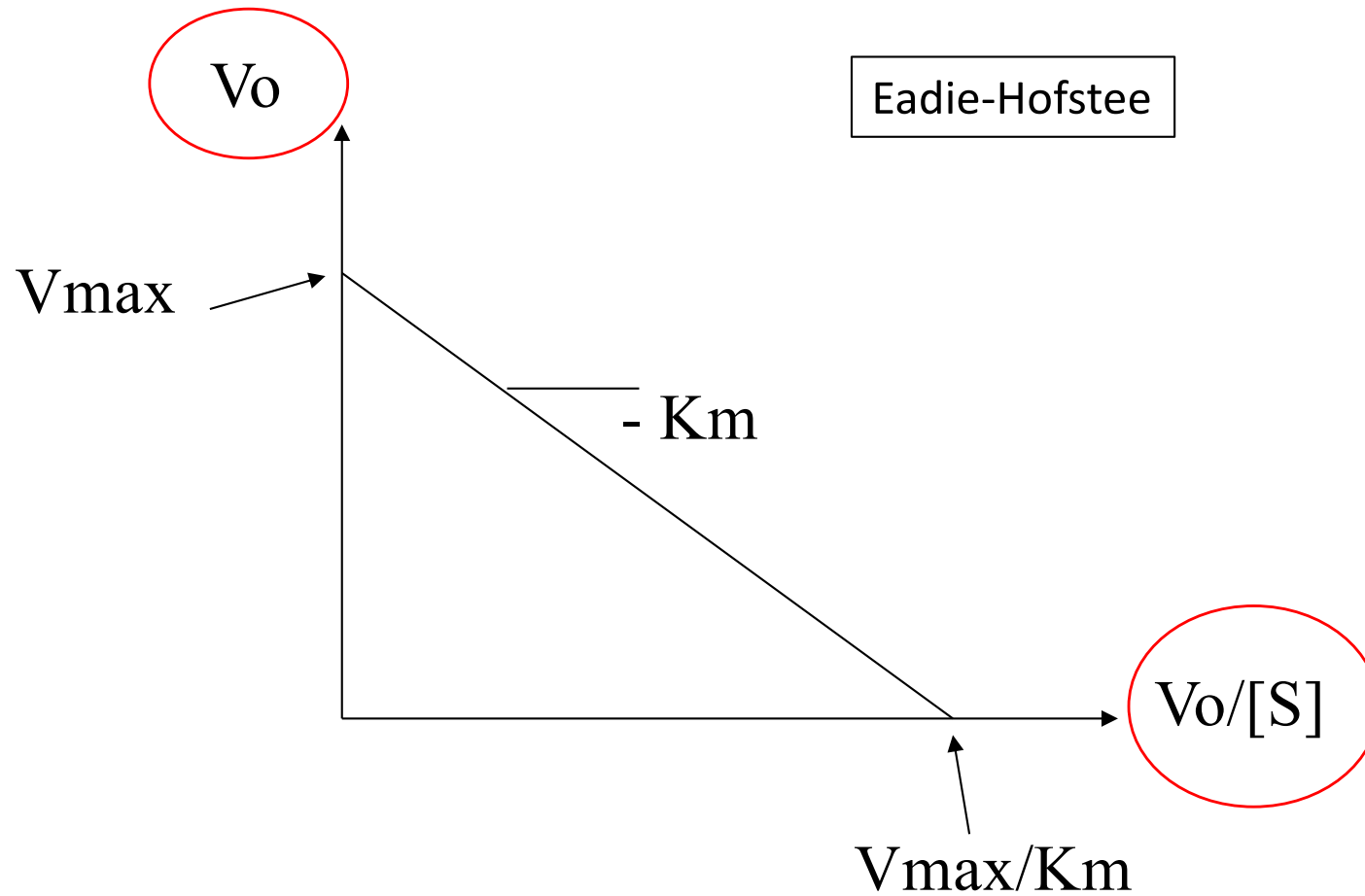
$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$





# Mesure $V_{max}$ + $K_m$

$$V_o = V_{max} - K_m \cdot V_o/[S]$$



$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

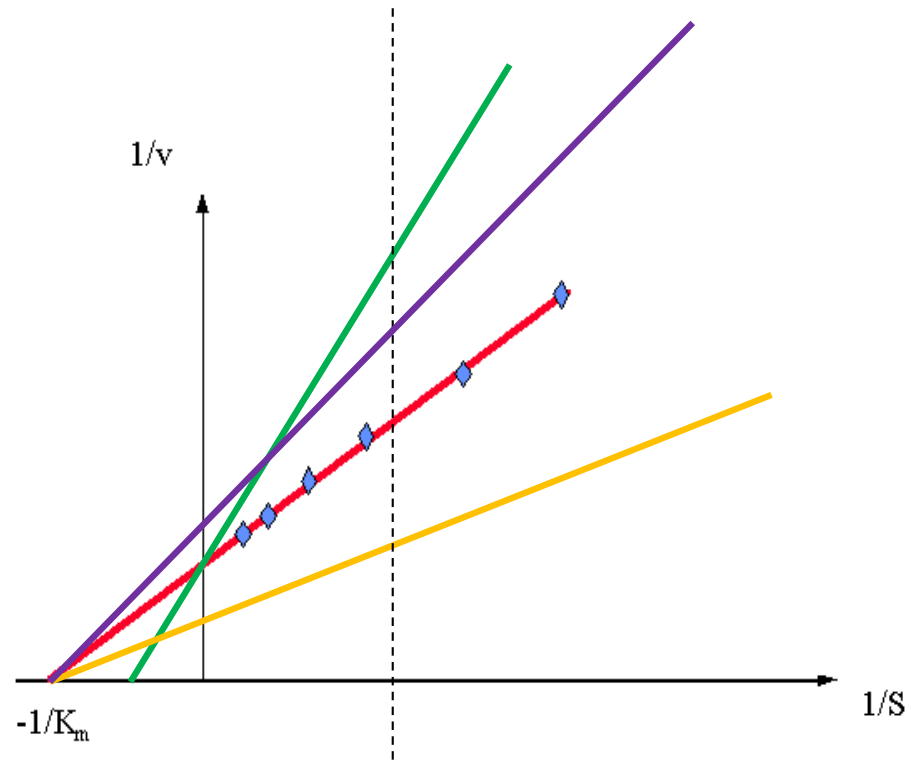
$$[S] = n K_m \rightarrow V_0 = V_{\max} \frac{n}{n+1}$$

Exemple :  $S = K_m \rightarrow V_0 = V_{\max} \frac{1}{1+1} = V_{\max}/2 !!!$

*Lorsque dans un exercice, vous avez les valeurs numériques de (S) et de Km, exprimez systématiquement (S) en nombre de Km...*

*Idem pour (I) et Ki ...*

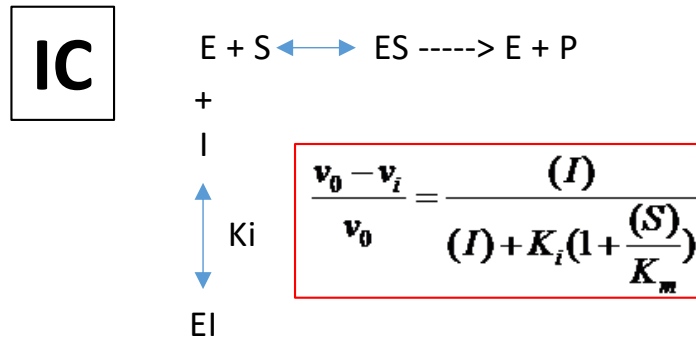
# Inhibiteurs



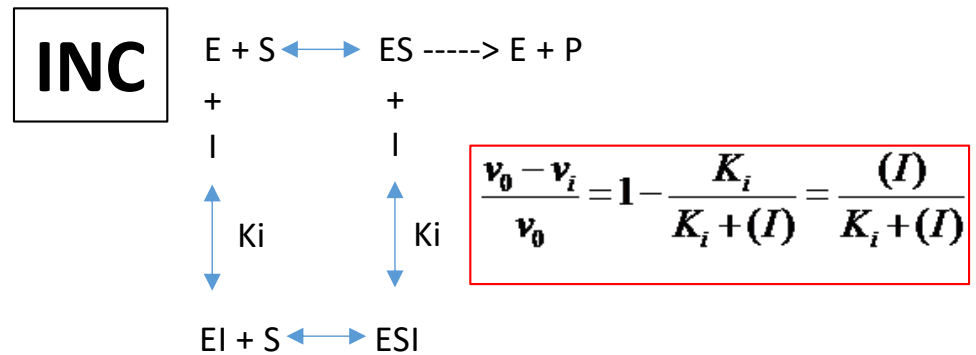
+ IIC...

$$v_{0app} = \frac{V_{maxapp} \cdot [S]}{K_{mapp} + [S]}$$

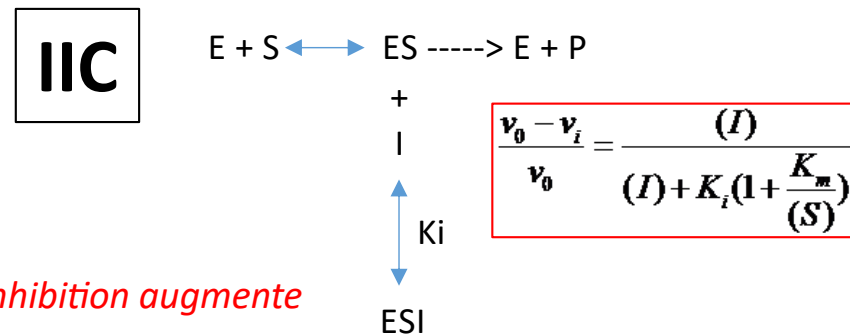
- $K_i$  : constante de dissociation de l'inhibiteur
- Facteur d'inhibition =  $1 + I/K_i$



*Si S augmente, inhibition diminue*



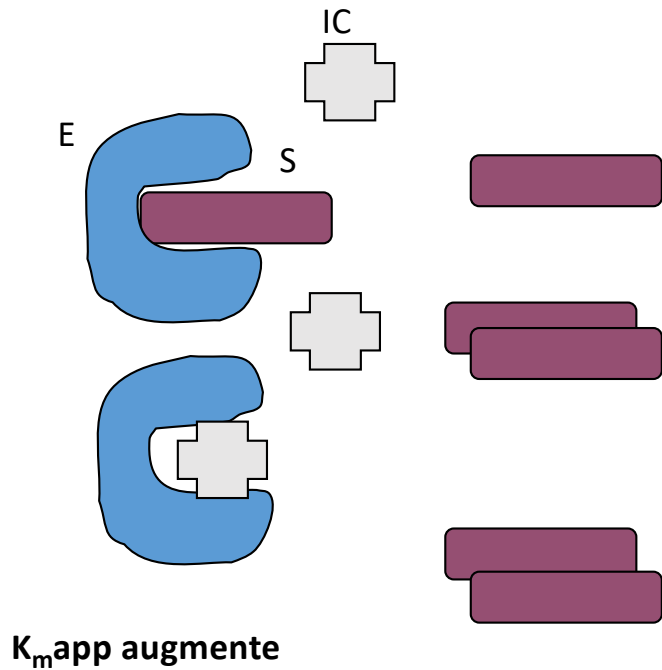
*Si S augmente, inhibition est la même*



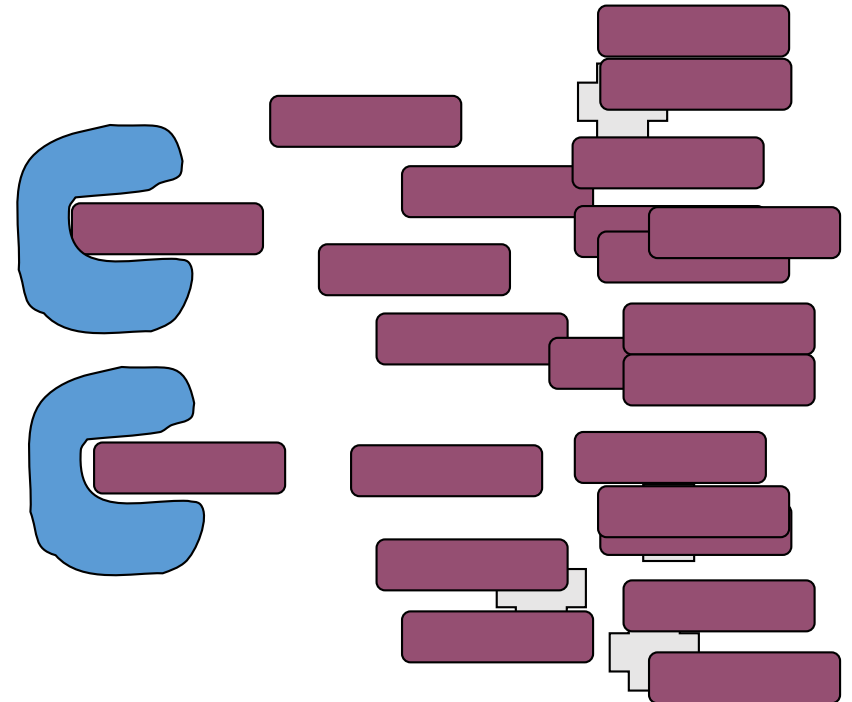
*Si S augmente, inhibition augmente*

# Inhibition compétitive

En condition de  $V_0 = \text{excès de substrat}$ ,  
L'IC inhibe  $\rightarrow V_0$  app ou mesurée diminue



En condition de  $V_{\max} = \text{excès +++++ de substrat}$ ,  
l'IC « n'est plus là », l'IC n'inhibe plus  $\rightarrow V_{\max}$  app identique



**Le rendement  $\rho$**  en AE (%) est un critère quantitatif : il correspond au rapport entre la **quantité d'enzyme récupérée** en fin d'étape et la **quantité d'enzyme introduite** en début d'étape. La quantité d'enzyme dénommée quantité catalytique (QC) s'exprime en unités arbitraires (U, katal) et se calcule par le produit (en unités compatibles) de la concentration catalytique et du volume, e.g.,  
 $QC (U) = CC (U/L) * volume (L)$

**$\rho = Qtt \text{ catal finale} / Qtt \text{ catal initiale} \times 100 (\%)$**

**Pas de rendement > 100% !!!**

**L'activité spécifique (AS)** est un critère plutôt qualitatif : l'AS exprime la quantité d'enzyme (QC) dans le milieu par rapport à la quantité de protéines totales.

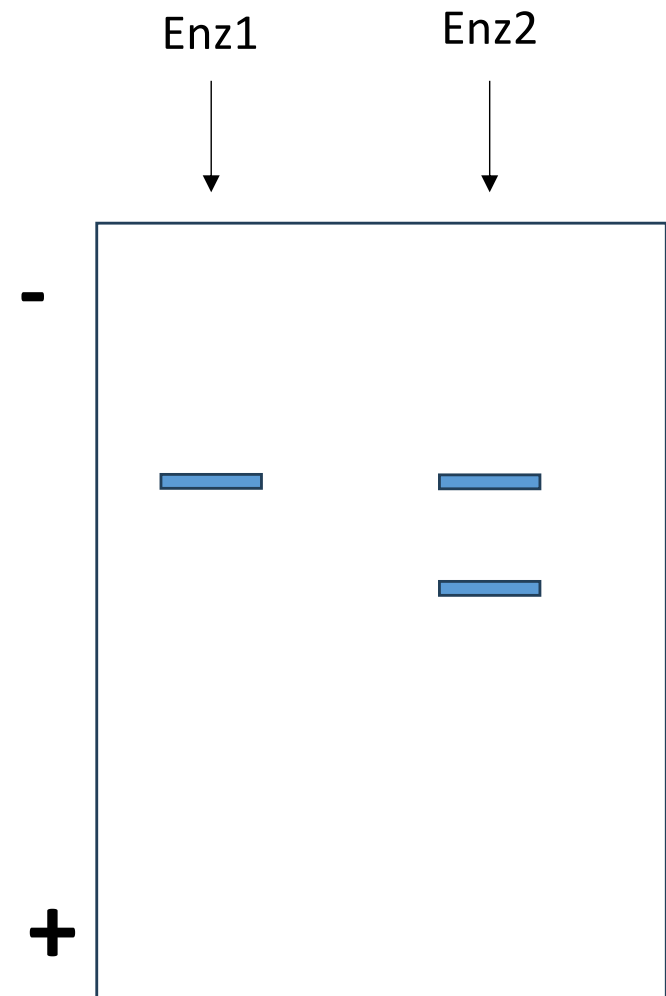
Calculer par le rapport (en unités compatibles) entre la concentration d'enzyme (CC) et la concentration en protéines totales

**$AS(U/g \text{ de protéines totales}) = Qtt \text{ Cat} / Qtt \text{ prot totales} = CC (U/L) / [prot \text{ totales}] (g/L)$**

**Le degré de purification** ou facteur/index de purification/d'enrichissement est aussi un critère qualitatif : il mesure l'efficacité d'une étape de purification par le rapport des AS en fin d'étape et en début d'étape

**Degré de purification = AS (fin) / AS (début) sans unité**

- Allostérie ?
- Electrophorèse PAGE-SDS et enzymologie ?
- Masse molaire de l'enzyme ?
- Isoenzymes ?
- Dosage d'un substrat en mode cinétique ?
- ...



## Exercice 1

On désire étudier une  $\alpha$ -glucosidase, enzyme hydrolysant spécifiquement les glucosides liés en  $1\alpha$ . L'enzyme est dissoute en tampon, le substrat utilisé est le méthyl- $1\alpha$ -glucose (méthylglucose) à  $50 \mu\text{moles.L}^{-1}$ , et les produits formés sont le méthanol et le glucose.

Dans une première expérience, on mesure la concentration d'un des produits (P) formés en fonction du temps :

<b>[P]</b> en nmoles.L <sup>-1</sup>	<b>temps</b> en secondes (s)
10	60
20	120
30	180
40	240
45	300
48	360

- Écrire le schéma de la réaction catalysée par l'enzyme. Pourquoi le substrat est-il spécifique de l'enzyme ?
- Quelle est la durée (minimale) de la phase stationnaire ?
- Quelle est l'activité de cette  $\alpha$ -glucosidase en  $\text{U.L}^{-1}$  ? en  $\text{mKat/L}$  ?



## Exercice 1

On désire étudier une  $\alpha$ -glucosidase, enzyme hydrolysant spécifiquement les glucosides liés en 1 $\alpha$ . L'enzyme est dissoute en tampon, le substrat utilisé est le méthyl-1 $\alpha$ -glucose (méthylglucose) à 50  $\mu\text{moles.L}^{-1}$ , et les produits formés sont le méthanol et le glucose.

Dans une première expérience, on mesure la concentration d'un des produits (P) formés en fonction du temps :

<b>[P]</b> en nmoles.L <sup>-1</sup>	<b>temps</b> en secondes (s)
10	60
20	120
30	180
40	240
45	300
48	360

- *méthyl 1 $\alpha$  glucose + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  méthanol + glucose*
- *240 secondes (entre 240 et 300 secondes)*
- *V<sub>0</sub> = 10 nM par minute = 0,01  $\mu\text{M}$  par minute  $\rightarrow$  AE = 0,01 U/L*
- *AE = 0,01 U/L = 0,01/60.10<sup>6</sup> = 1,66.10<sup>-10</sup> Kat/L = 1,66.10<sup>-7</sup> mKat/L*

- Écrire le schéma de la réaction catalysée par l'enzyme. Pourquoi le substrat est-il spécifique de l'enzyme ?
- Quelle est la durée (minimale) de la phase stationnaire ?
- Quelle est l'activité de cette  $\alpha$ -glucosidase en U.L<sup>-1</sup> ? en mKat/L ?

Dans une deuxième expérience, sur une préparation purifiée de l'enzyme, on détermine par la même méthode les  $v_0$  en fonction de la concentration de substrat (S), et on obtient les résultats expérimentaux suivants :

<b>[S]</b> en $\mu\text{moles.L}^{-1}$	<b><math>v_0</math></b> en $\text{nmoles.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$
1	16,7
2	28,6
5	50
10	66,7
40	88,9
50	90,9
100	95,2
200	97,6
250	99,4

- Cette  $\alpha$ -glucosidase est-elle une enzyme michaelienne ? Si oui, quelle est sa  $K_m$  pour le méthylglucose ?
- Pour une concentration en méthylglucose de  $55 \mu\text{M}$ , quelle proportion de la  $V_{\text{max}}$  est atteinte ? Quels sont les intérêts de se rapprocher le plus possible de la  $V_{\text{max}}$  ?
- Rappelez les conditions « idéales » pour déterminer une activité enzymatique.

Dans une deuxième expérience, sur une préparation purifiée de l'enzyme, on détermine par la même méthode les  $v_0$  en fonction de la concentration de substrat (S), et on obtient les résultats expérimentaux suivants :

[S] en $\mu\text{moles.L}^{-1}$	$v_0$ en $\text{nmoles.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$
1	16,7
2	28,6
5	50
10	66,7
40	88,9
50	90,9
100	95,2
200	97,6
250	99,4

- *Oui,  $V_0$  en fonction  $S = \text{hyperbole}$  ;  $V_{\text{max}}$  proche de 100  $\rightarrow V_{\text{max}}/2$  proche de 50 et concentration en  $S$  correspondante =  $K_m = 5 \mu\text{M}$*
- *$S = 55 \mu\text{M} = 11 K_m \rightarrow V_0 = 11/12 V_{\text{max}} = 0,92 V_{\text{max}}$  ;  $V_{\text{max}}$  = pente la + forte possible (+ facile à mesurer) pendant le temps le + long (on a plus le temps); plus grande gamme de mesure.*
- *$S \gg E$  pour être le plus proche possible des conditions de  $V_{\text{max}}$  (pbe du coût du  $S$  ; solubilité...). Réaction dans un seul sens (début de la Rn), température, pH, force ionique, cofacteurs etc. etc.*

- **Cette  $\alpha$ -glucosidase est-elle une enzyme michaelienne ? Si oui, quelle est sa  $K_m$  pour le méthylglucose ?**
- **Pour une concentration en méthylglucose de  $55 \mu\text{M}$ , quelle proportion de la  $V_{\text{max}}$  est atteinte ? Quels sont les intérêts de se rapprocher le plus possible de la  $V_{\text{max}}$  ?**
- **Rappelez les conditions « idéales » pour déterminer une activité enzymatique.**

## Exercice 2

Le diabète MODY-2 est dû à une anomalie de la glucokinase. Au laboratoire, nous entreprenons d'étudier l'activité de cette enzyme, obtenue à partir de cellules d'un sujet « sain » et d'un sujet malade, en faisant varier la concentration en substrat [S] (le substrat dans le cas présent est le glucose) et en mesurant la vitesse enzymatique initiale ( $V_0$ ). Les mesures sont réalisées dans un volume réactionnel final de 1 ml. Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

[S] (mM)	0,5	1	1,5	2	3	4	8	16
Sujet sain $V_0$ (mM.mn <sup>-1</sup> )	0,45	0,75	0,9	1,2	1,7	2,1	2,4	2,4
Sujet malade $V_0$ (mM.min <sup>-1</sup> )	0,1	0,15	0,22	0,3	0,45	0,5	0,6	0,6

→ Déterminer la  $V_{max}$ , la  $K_m$  chez le sujet sain et chez le sujet malade.

→ Parmi les propositions suivantes indiquer la (les) bonne(s) réponse(s):

- A. L'affinité de la glucokinase du sujet malade pour le glucose est inférieure à celle du sujet sain.
- B. La vitesse maximale de la glucokinase du sujet malade est inférieure à celle du témoin.
- C. Lorsque l'enzyme du sujet malade est saturée, l'activité enzymatique est de 6 UI (unité enzymatique).
- D. Dans le cas de la glucokinase du sujet malade, le glucose est considéré comme un inhibiteur compétitif.
- E. La réaction catalysée par la glucokinase est réversible.

## Exercice 2

Le diabète MODY-2 est dû à une anomalie de la glucokinase. Au laboratoire, nous entreprenons d'étudier l'activité de cette enzyme, obtenue à partir de cellules d'un sujet « sain » et d'un sujet malade, en faisant varier la concentration en substrat [S] (le substrat dans le cas présent est le glucose) et en mesurant la vitesse enzymatique initiale ( $V_0$ ). Les mesures sont réalisées dans un volume réactionnel final de 1 ml. Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

[S] (mM)	0,5	1	1,5	2	3	4	8	16
Sujet sain $V_0$ (mM.min <sup>-1</sup> )	0,45	0,75	0,9	1,2	1,7	2,1	2,4	2,4
Sujet malade $V_0$ (mM.min <sup>-1</sup> )	0,1	0,15	0,22	0,3	0,45	0,5	0,6	0,6

→ Déterminer la  $V_{max}$ , la  $K_m$  chez le sujet sain et chez le sujet malade.

→ Parmi les propositions suivantes indiquer la (les) bonne(s) réponse(s):

A. L'affinité de la glucokinase du sujet malade pour le glucose est inférieure à celle du sujet sain.

B. La vitesse maximale de la glucokinase du sujet malade est inférieure à celle du témoin.

C. Lorsque l'enzyme du sujet malade est saturée, l'activité enzymatique est de 6 UI (unité enzymatique).  
*Saturée →  $V_{max} = 0,6 \text{ mM/min} = 600 \mu\text{M/min}$  ; correspond à  $600 \text{ U/L}$  ;  $1 \text{ mL} \rightarrow 0,6 \text{ U}$*

D. Dans le cas de la glucokinase du sujet malade, le glucose est considéré comme un inhibiteur compétitif.

E. La réaction catalysée par la glucokinase est réversible.

*$V_{max_{Sain}} = 2,4 \text{ mM/min}$  ;  
 $V_{max_{Malade}} = 0,6 \text{ mM/min}$  ;  
 $K_{m_{Sain}} = 2 \text{ mM}$  ;  
 $K_{m_{Malade}} = 2 \text{ mM}$*

On désire étudier une préparation de lactate-déshydrogénase (LDH) en utilisant la réaction naturelle de transformation du pyruvate. Pour cela, on ajoute 50  $\mu\text{l}$  de cette préparation à 0,95 ml d'une solution de pyruvate et de  $\text{NADH,H}^+$  tamponnée à pH 7,4 ; après agitation, le mélange est placé dans une cuve de 1 cm ; l'absorbance est lue immédiatement à 340 nm dans un spectrophotomètre dont le zéro a été réglé sur l'air. Du fait de la concentration en  $\text{NADH,H}^+$  utilisée, la réaction est rendue irréversible.

On obtient les résultats suivants :

Temps (en sec)	A <sub>340 nm</sub>
0	1,495
10	1,490
20	1,485
30	1,480
60	1,470
90	1,468
120	1,468

**Rappel : loi de Beer Lambert**  $A = \epsilon.l.c$  avec A, absorbance (sans unité) ;  $\epsilon$ , coefficient d'extinction molaire  $\text{NADH,H}^+$  (340 nm) =  $6,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}.\text{mole}^{-1}.\text{L}$  et l, longueur de la cuve en cm.

### Questions :

- 1- Rappelez le principe de la méthode pour déterminer l'activité LDH.
- 2- Calculez la quantité de pyruvate contenue au départ dans le milieu réactionnel.
- 3- Calculez la quantité de pyruvate transformée en 60 secondes.
- 4- Calculez l'activité de la LDH dans la préparation en l'exprimant en  $\text{nkat.L}^{-1}$ . Généralisez ce mode de calcul.

On désire étudier une préparation de lactate-déshydrogénase (LDH) en utilisant la réaction naturelle de transformation du pyruvate. Pour cela, on ajoute 50 µl de cette préparation à 0,95 ml d'une solution de pyruvate et de NADH,H<sup>+</sup> tamponnée à pH 7,4 ; après agitation, le mélange est placé dans une cuve de 1 cm ; l'absorbance est lue immédiatement à 340 nm dans un spectrophotomètre dont le zéro a été réglé sur l'air. Du fait de la concentration en NADH,H<sup>+</sup> utilisée, la réaction est rendue irréversible.

On obtient les résultats suivants :

Temps (en sec)	A340 nm
0	1,495
10	1,490
20	1,485
30	1,480
60	1,470
90	1,468
120	1,468

- *Pyruvate + NADH, H<sup>+</sup> → Lactate + NAD<sup>+</sup> ; pour déterminer l'activité de la LDH, il faut mesurer V<sub>0</sub> de cette réaction catalysée par la LDH ; suivre la consommation du NADH,H<sup>+</sup> en fonction du temps ; Pour le NADH,H<sup>+</sup>, A = εLC --> V<sub>0</sub> = deltaA/deltat X 1/ εL ; deltaA/deltat pendant la phase stationnaire. Si on exprime V<sub>0</sub> en µM/min → A en U/L ; si on exprime V<sub>0</sub> en M/sec → A en Kat/L*
- *Réaction irréversible donc toujours en conditions de V<sub>0</sub> → Si A ne diminue plus, c'est qu'il n'y a plus de pyruvate. Delta A entre « il y a du pyruvate » et « il y en a plus » = 1,495-1,468 = correspond à la quantité de NADH,H<sup>+</sup> consommée = quantité de pyruvate de départ. C<sub>pyruvate</sub> = deltaA x 1/εL = 0,027/6300 = 4,29 µM ; 1 mL donc 0,00429 µmoles ; pour 60 secondes, même calcul avec 1,495-1,470*

**Rappel : loi de Beer Lambert**  $A = \epsilon.l.c$  avec A, absorbance (sans unité) ;  $\epsilon$ , coefficient d'extinction molaire NADH,H<sup>+</sup> (340 nm) =  $6,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}.\text{mole}^{-1}.\text{L}$  et l, longueur de la cuve en cm.

### Questions :

- 1- Rappelez le principe de la méthode pour déterminer l'activité LDH.
- 2- Calculez la quantité de pyruvate contenue au départ dans le milieu réactionnel.
- 3- Calculez la quantité de pyruvate transformée en 60 secondes.
- 4- Calculez l'activité de la LDH dans la préparation en l'exprimant en nkat.L<sup>-1</sup>. Généralisez ce mode de calcul.

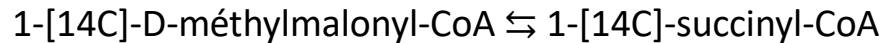
○  $V_0 = (0,005/10) \times (1/6300) \times 20 = 1,587 \cdot 10^{-6}$  moles par seconde et par L = 1587 nmoles par seconde et par L  
 → AE = 1587 nKat/L ; AE = deltaA/deltat X F ; avec F =  $20 \times 10^9/6300$

## ENSEMBLE

Afin de mesurer l'activité de la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM) dans un lysat cellulaire purifié vous disposez de quatre réactifs, les volumes entre parenthèses correspondent aux volumes à utiliser pour réaliser la réaction :

- une solution de substrat marqué au  $^{14}\text{C}$  de D-méthylmalonyl-CoA de concentration égale à 2 mM (400  $\mu\text{L}$ )
- une solution contenant entre autre un tampon adapté à la mesure de la MCM (750  $\mu\text{L}$ )
- une solution du coenzyme de la MCM (600  $\mu\text{L}$ )
- un lysat cellulaire purifié dont la concentration en protéines totales est de 5 mg/L (250  $\mu\text{L}$ ).

La MCM catalyse la réaction suivante :



Le  $K_m$  de la MCM pour le D-méthylmalonyl-CoA est de 0.2 mM

Dans une première étape vous devez choisir les trois réactifs que vous allez mettre pendant 5 minutes dans un tube à essais à 37°C avant de déclencher la réaction avec le quatrième réactif. Votre choix doit garantir une plus grande spécificité de la réaction

1) Quels sont les trois réactifs que vous choisissez pour cette première étape, quel nom porte-t'elle et à quoi sert-elle ? Une fois la réaction déclenchée, vous prélevez 200  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel toutes les minutes que vous plongez immédiatement dans 800  $\mu\text{L}$  d'acide perchlorique glacial.

2) A quoi sert l'acide perchlorique glacial ?

Le succinate radiomarqué formé est séparé du substrat n'ayant pas réagi et on compte la radioactivité associée au produit de la réaction. Voici les résultats obtenus :

Temps	cpm
1	3000
2	6000
3	9000
4	12000
5	14500
6	16900
7	17500
8	17600
9	17650
10	17650



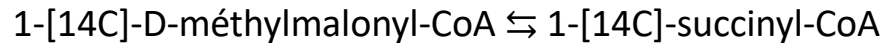
## ENSEMBLE

Afin de mesurer l'activité de la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM) dans un lysat cellulaire purifié vous disposez de quatre réactifs, les volumes entre parenthèses correspondent aux volumes à utiliser pour réaliser la réaction :

- une solution de substrat marqué au  $^{14}\text{C}$  de D-méthylmalonyl-CoA de concentration égale à 2 mM (400  $\mu\text{L}$ )
- une solution contenant entre autre un tampon adapté à la mesure de la MCM (750  $\mu\text{L}$ )
- une solution du coenzyme de la MCM (600  $\mu\text{L}$ )
- un lysat cellulaire purifié dont la concentration en protéines totales est de 5 mg/L (250  $\mu\text{L}$ ).

$$5 \text{ mg/L} = 0,005 \text{ g/L} = 0,005 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

La MCM catalyse la réaction suivante :



Le  $K_m$  de la MCM pour le D-méthylmalonyl-CoA est de 0.2 mM

Dans une première étape vous devez choisir les trois réactifs que vous allez mettre pendant 5 minutes dans un tube à essais à 37°C avant de déclencher la réaction avec le quatrième réactif. Votre choix doit garantir une plus grande spécificité de la réaction

1) Quels sont les trois réactifs que vous choisissez pour cette première étape, quel nom porte-t'elle et à quoi sert-elle ? Une fois la réaction déclenchée, vous prélevez 200  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel toutes les minutes que vous plongez immédiatement dans 800  $\mu\text{L}$  d'acide perchlorique glacial.

2) A quoi sert l'acide perchlorique glacial ?

Le succinate radiomarqué formé est séparé du substrat n'ayant pas réagi et on compte la radioactivité associée au produit de la réaction. Voici les résultats obtenus :

Temps	cpm
1	3000
2	6000
3	9000
4	12000
5	14500
6	16900
7	17500
8	17600
9	17650
10	17650

- Tous les réactifs sauf le substrat (méthylmalonyl coA) ; étape de pré-incubation : mise à température, stabilisation pH, réactions parasites, association enz-coenz ; réactif contenant le substrat = réactif déclenchant.
- L'acide perchlorique sert à stopper la réaction à des temps définis

## ENSEMBLE

3) Calculez l'activité enzymatique dans le lysat cellulaire que vous exprimerez en cpm/min/µg de protéine.

4) En déduire l'activité enzymatique que l'on aurait obtenue dans le lysat cellulaire dans les mêmes conditions si l'enzyme avait été saturée par son substrat.

5) La réaction est reproduite à l'identique (mêmes constituants, mêmes conditions opératoires) mais on ajoute une poudre en plus à la première étape (on considère le volume de la poudre P comme négligeable). En présence de la poudre contenant un composé P pur, il est déterminé, à partir d'une série de manipulations, une valeur du Km de la MCM égale à 50 µM et une Vmax égale à 9000 cpm/min/µg. Que peut-on dire de P ? (justifier)

6) En déduire la concentration du composé constituant la poudre P en l'exprimant en fonction de la constante de dissociation P-MCM.

7) Comment évoluerait l'activité enzymatique si on doublait la quantité de substrat en présence de la même quantité de produit P. Expliquer

- Il est demandé dans l'énoncé d'exprimer l'AE du lysat cellulaire en cpm/min/µg de protéines (équivalent à une vitesse rapportée à 1 µg de protéines). Je fais ce qu'on me dit de faire ; donc AE = 3000 cpm par minute pour (0,005X250)/10 = 0,125 µg de protéines → AE = 3000/0,125 = 24000 cpm par minute par µg de protéines. **Selon moi (et après longue réflexion), il ne faut plus modifier cette valeur puisque on se rapporte à une quantité de protéines et non à un volume.**
- Enzyme saturée correspond à la Vmax. Substrat à la concentration de 2mM, et 400 µL dans un volume total de 2000 µL = dilution au 5<sup>ème</sup> → (S) dans le milieu réactionnel = 0,4 mM ; (S) = 2 Km → V0 = 2/3 Vmax → Vmax = 1,5 V0 = 36000 cpm par minute et par µg de protéines.
- KmP = 0,05 mM = ¼ Km et VmaxP = 9000 cpm/min/µg = ¼ Vmax. Les 2 valeurs sont divisées par un même facteur → inhibition incompétitive (IIC) ; P se fixe uniquement sur le complexe ES
- VmaxP = Vmax/(1+P/Kp) → 1+P/Kp = Vmax/VmaxP = 4 → 1+P/Kp = 4 → P/Kp = 3 → **P = 3 Kp**

$$\frac{v_0 - v_i}{v_0} = \frac{(I)}{(I) + K_i \left(1 + \frac{K_m}{(S)}\right)}$$