

On effectue 2 series de mesures d'activité enzymatiques sur l'élastase: la 1^{ière} en absence d'inhibiteur et la 2^{ème} en présence de l'inhibiteur α -1 AntiTrypsine (a1AT) à 12,5 μ M. Les résultats sont reportés dans le tableau ci dessous.

(S) ₀ en μ M	v ₀ en μ mol/L/min (I) = 0 μ M	v ₀ en μ mol/L/min (I) = 12,5 μ M
300	0,666	0,533
150	0,5	0,4
100	0,4	0,32
75	0,333	0,267

Q1 : Exprimez ces résultats dans la représentation aux inverses (Lineweaver) et calculez les K_M et V_{max}.

Q2 : Déduisez en le type d'inhibition et calculez la constante de dissociation du complexe EI

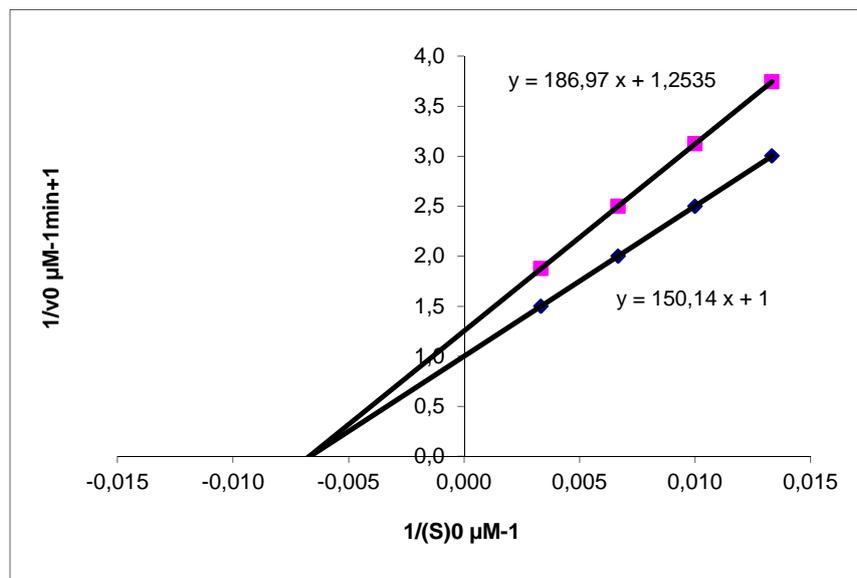
Q3 : définissez ce qu'est l'IC₅₀ et démontrez par le calcul que dans le cas de l'a1AT et de l'élastase l' IC₅₀ est égale à la constante de dissociation du complexe EI

Q 1 :

Lineweaver Burck : $1/v = f(1/S)$

$(S)_0$ en μM	$1/(S)$	v_0 en $\mu\text{M}/\text{min}$ (I) = 0 μM	$1/V_0$	v_0 en $\mu\text{M}/\text{min}$ (I) = 12,5 μM	$1/V_0$
300	0,0033	0,666	1,5	0,533	1,88
150	0,0067	0,5	2,0	0,4	2,50
100	0,0100	0,4	2,5	0,32	3,13
75	0,0133	0,333	3,0	0,267	3,75

- l'interprétation du graphique avec les valeurs de :
 - o K_m (inchangée) = 150 μM ($1/0.00667$)
 - o V_{max} = 1 $\mu\text{mol/L}/\text{min}$ ($1/1$)
 - o V_{max} apparente pour (I) = 12,5 μM = 0,798 $\mu\text{mol/L}/\text{min}$ ($1/1.25$)
- donc en conclusion : inhibition de type non compétitive



Q 2 :

Dans le cas d'une inhibition non compétitive :

- V_{max} apparente = $V_{\text{max}} / [1 + (I) / K_i] = 0,8 \mu\text{mol/L}/\text{min}$
- l'application de cette équation avec (I) = 12,5 μM donne $1,25 = 1 + (I)/K_i$ soit $0,25 = 12,5/K_i$ donc $K_i = 50 \mu\text{M}$

Q3 :

Concentration en inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse de la réaction de 50% (où 50% d'inhibition de l'activité enzymatique)

- 1^{er} solution

1^{er} équation exprimer V_i en fonction de K_{mapp} (c'est K_m) et $V_{mapp} = V_{max} / [1 + (I) / K_i]$

2^{eme} equation $V_i = 1/2 V_0 = 1/2 V_m \cdot [S] / (K_m + [S])$

les deux équations sont égales :

$$V_i = \frac{V_m [S] / (1 + \frac{I}{K_i})}{[S] + K_m} = 1/2 V_m \cdot [S] / (K_m + [S])$$

$$\frac{1}{[S] + K_m} = \frac{V_m [S]}{2(K_m + [S])} \cdot \frac{1 + I/K_i}{V_m [S]}$$

$$2 = 1 + I/K_i \text{ donc } I = K_i$$

- 2^{eme} solution vous connaissez la formule du % d'inhibition $V_0 - V_i / V_0 = I / I + K_i$ et vous en déduisez directement que pour avoir $V_i = 1/2 V_0$ alors $[I] = K_i$

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des esters de l'acide phosphorique. Pour mesurer l'activité enzymatique on utilise un substrat synthétique le paranitrophényl-phosphate ou PNPP (MM = 371 g/mol) qui libère du paranitrophénol ou PNP (MM = 139 g/mol) absorbant à 410 nm en milieu alcalin avec un coefficient d'extinction spécifique = $143,9 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La vitesse de la réaction est mesurée en conditions de vitesse initiale sur une série de tubes contenant des concentrations croissantes en substrat. Chaque tube contient 1,96 mL de milieu réactionnel tamponné contenant une quantité donnée de substrat. Pour chaque tube la réaction est initialisée par ajout de 40 μL d'une solution d'enzyme à 10 mg en protéines totales/mL et agitation. Le contenu du tube est ensuite immédiatement versé dans la cuve de lecture de 1 cm de trajet optique. Les variations d'absorbance à 410 nm lues sur la partie linéaire de la cinétique et rapportées à la minute sont indiquées ci dessous.

PNPP en mg/tube	0,1855	0,371	0,742	1,484
PNPP en μM dans chaque tube				
$\Delta\text{DO} \cdot \text{min}^{-1}$	0,10	0,15	0,20	0,24
vitesse initiale v_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)				
$v_0/(S)$ en 10^{-3} min^{-1}				

Q1 - Calculez le coefficient d'extinction molaire du PNP à 410 nm

Q2 - Exprimez la relation reliant la vitesse initiale v_0 exprimée en $\mu\text{mol}/\text{L}/\text{min}$ à la variation d'absorbance par minute dans le tube. En déduire la valeur du facteur F dans la relation :

Q3 - Complétez le tableau ci-dessus et calculez K_m et V_{max} en exprimant graphiquement ces valeurs dans la représentation d'Eadie-Hofstee

Q4 - Calculez l'activité spécifique de l'enzyme dans chacun des tubes en conditions conventionnelles de saturation de l'enzyme par le substrat.

Q5 - Quelle est (ou quelles sont) l' (ou les) information(s) qui manque(nt) pour calculer la constante catalytique de l'enzyme. Comment pourrait-on expérimentalement obtenir cette (ces) information(s) ?

R1 - E molaire = E spécifique * MM = 143,9 * 139 = 20002 mol-1.L.cm-1

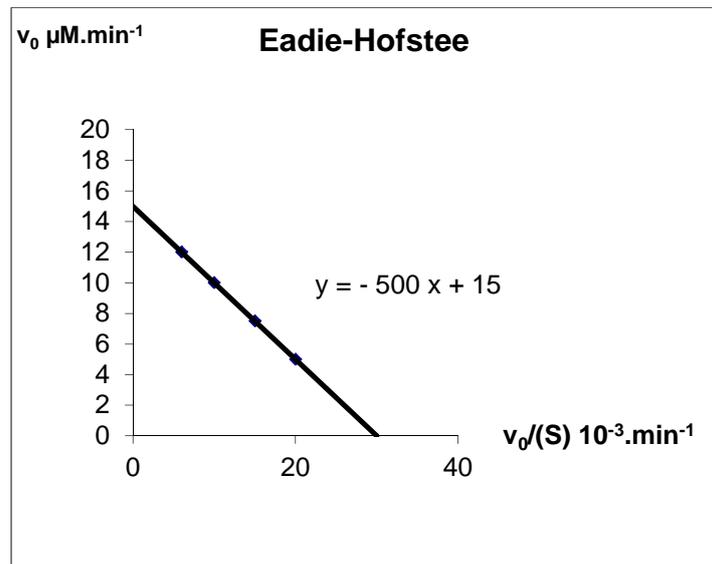
R2 - v_0 exprimée en $\mu\text{mol/L/min} = \Delta(\text{PNP}) \text{ en } \mu\text{M} / \Delta t \text{ en min} = \Delta\text{DO}.\text{min}^{-1} * 10^6/\epsilon \text{ molaire} = \Delta\text{DO}.\text{min}^{-1} * F$

$F = 10^6/\epsilon \text{ molaire} = 10^6 / (143,9 * 139) = 50 \mu\text{M}$

R3 -

PNPP en mg/tube	0,1855	0,371	0,742	1,484
PNPP en μM dans chaque tube	250	500	1000	2000
$\Delta\text{DO}.\text{min}^{-1}$	0,10	0,15	0,20	0,24
vitesse initiale v_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	5	7,5	10	12
$v_0/(S)$ en $10^{-3}.\text{min}^{-1}$	20	15	10	6

$K_m = 500 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 15 \mu\text{M}/\text{min}$

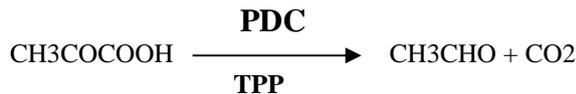


R4 - La solution d'enzyme dans chaque tube est diluée au $2000/40 = 50^{\text{ème}}$. Donc (PT) dans chaque tube = $10/50 = 0,20 \text{ mg/mL}$ ou $0,20 \text{ g/L}$ et $AS = V_{\text{max}}$ (convertie en U/L) / (PT en g/L)

$AS = 15 / 0,2 = 75 \text{ U/g de PT}$

R5 – Il manque la concentration molaire en enzyme dans le tube. Pour l'obtenir il faut démontrer que la solution d'enzyme est pure et déterminer la MM de l'enzyme. La technique la plus simple serait de faire un PAGE-SDS.

Chez la levure, la fermentation anaérobie entraîne la production de CO₂ et d'éthanol. Les 2 étapes terminales de cette voie métabolique sont les suivantes :



PDC : pyruvate décarboxylase

ADH : alcool déshydrogénase

TPP : thiamine pyrophosphate (dérivé de la vitamine B1)

L'alcool déshydrogénase est inhibée par l'acétone. Pour déterminer le mode d'action de cet inhibiteur, 2 expériences sont entreprises.

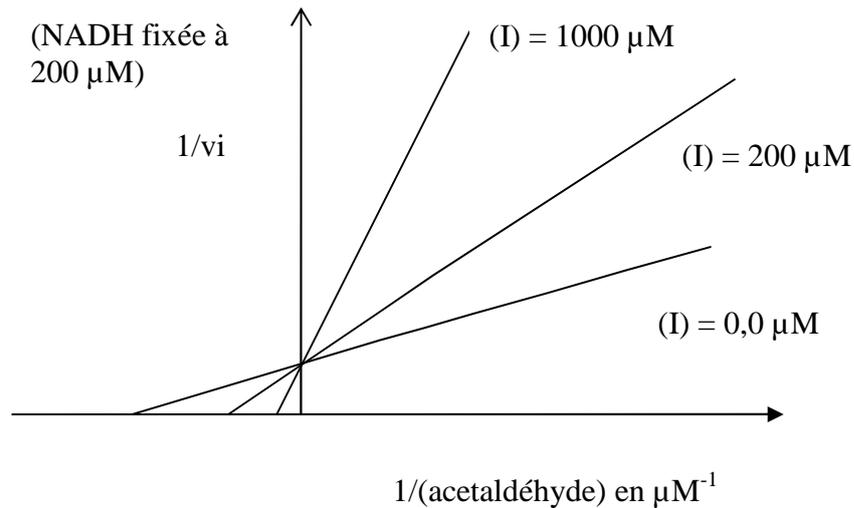
1^o) Dans la 1^{ère} expérience la concentration en acétaldéhyde est fixée à 200 μM (en excès), la concentration en NADH est variable et on travaille avec ou sans inhibiteur (acétone) à concentration fixée.

NADH μM	vitesse initiale en μmol/min/mg		
	(I) = 0,0 μM	(I) = 200,0 μM	(I) = 1000,0 μM
2	11,1	10,3	8,1
4	20,7	18,2	12,2
12	48,6	36,7	18,6
20	66,7	46,2	20,7
25	75	50	21,4
40	92,3	57,1	22,6
50	100	60	23,1
100	120	66,7	24
500	142,9	73,2	24,8
2000	148,1	74,5	24,9
10000	149,6	74,9	25

Question 1 :

- Pourquoi se place t'on à une concentration fixée (et en excès) d'acétaldéhyde ?
- A partir des valeurs de ce tableau extrapolez (sans faire de graphique) les valeurs de Km et Vmax apparents (à l'égard du NADH,H⁺) en absence et en présence d'inhibiteur (acétone).
- Quel est le mécanisme d'inhibition par l'acétone le plus probable ? Expliquez.
- Déterminez le Ki par le calcul à partir des valeurs extrapolées du tableau (ou par une représentation secondaire).

2^o) Au cours d'une 2^{ème} expérience la concentration en NADH est fixée à 200 μM (en excès), la concentration en acétaldéhyde est variable et on travaille avec les mêmes concentrations d'inhibiteur (acétone). Les résultats sont représentés en doubles inverses dans la figure ci-dessous :

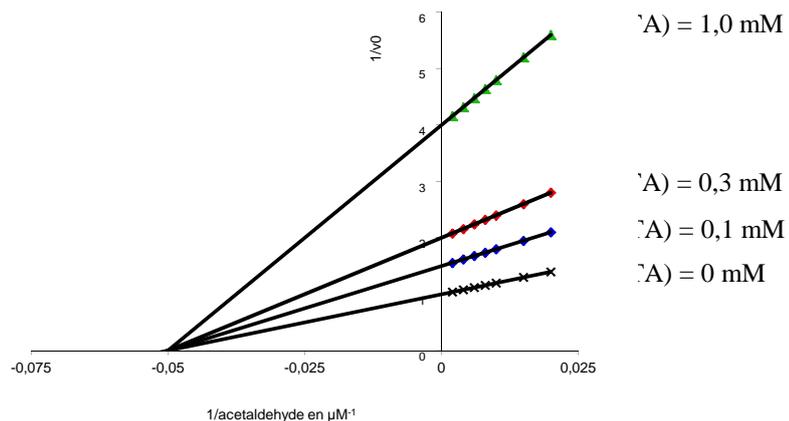


Question 2 :

a) Pourquoi se place t'on à une concentration fixée (et en excès) de NADH, H^+ ?

b) Quel est le mécanisme d'inhibition le plus probable de l'acétone vis à vis de l'acétaldéhyde ?

3• Le zinc (Zn^{2+}) est un métal indispensable à l'activité de l'ADH. L'EDTA est un agent chélatant de métaux bivalents et qui inhibe l'ADH. Au cours d'une 3^{ième} expérience la concentration en NADH est fixée à 200 μM , la concentration en acétaldéhyde est variable et on travaille sans ou avec une concentration fixée d'EDTA. Les résultats sont représentés en double inverse dans la figure ci-dessous :



Question 3 :

a) Quel est le mécanisme d'inhibition par l'EDTA et pourquoi ?

b) Quelle est l'étape (fixation ou catalyse ?) qui dans le mécanisme réactionnel requière du Zn^{2+} et pourquoi ?

Réponse 1:

a)

b)

[I] μM	K_{mapp} μM	V_{maxapp} $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$
0	25	150
200	12	75
1000	4	25

c) l'acétone agit probablement comme un inhibiteur incompétitif par rapport au NADH car K_m et V_{max} sont diminués d'un même facteur. Ceci signifie que le site de fixation de l'acétone ne devient fonctionnel qu'après fixation obligatoire du 1^{er} substrat : ici probablement le NADH car l'acétone est plutôt un analogue du 2^{ème} substrat.

d) Pour $(I) = 200 \mu\text{M}$: $K_{mapp} \# 12 = K_m/[1 + (I)/K_i] \# 25/[1 + (200)/K_i]$

$K_i \# 200 \mu\text{M}$

Pour la détermination graphique on peut choisir une représentation de l'inverse du K_{mapp} en fonction de (I) . L'intersection avec l'axe des x donne $-K_i$.

Réponse 2 :

a)

b) L'acétone se comporte comme un IC de l'acétaldéhyde pour la fixation sur le 2^{ème} site. Il est logique que l'acétone qui présente des analogies structurales avec l'acétaldéhyde, se comporte comme un IC à son égard.

Réponse 3 :

L'EDTA se comporte comme un INC vis à vis de l'acétaldéhyde.

Il diminue la V_{max} et donc la constante catalytique.

EPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION - Mai 2012

Exercice 2

Énoncé :

L'activité enzymatique de la créatine kinase (CK) dans le sérum est dosée selon le principe réactionnel suivant :

HK : hexokinase ; G-6-PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase.

La vitesse de formation du NADPH,H⁺ est mesurée à pH 6,50 et à 340 nm (coefficient d'absorbance molaire du NADPH,H⁺ = 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Protocole opératoire :

Température : 37 °C.

Introduire dans une cuve en quartz (trajet optique de 1 cm) :

réactif A 2,4 mL

sérum 0,1 mL

Après homogénéisation, le mélange est préincubé 3 min, puis la réaction est déclenchée par :

réactif B 0,5 mL

Après un temps de latence, l'absorbance est lue en continu à 340 nm (pendant 2 minutes).

La variation d'absorbance lue est en valeur absolue de 0,246.

Questions :

- 1) Quels sont les composés présents dans le mélange des réactifs A et B ? Quelles sont les conditions liées à leur concentration ? Justifier le choix de la longueur d'onde et indiquer le sens de la variation de l'absorbance.
- 2) Quelles sont les conditions à respecter concernant la cinétique réactionnelle pour que la mesure soit validée ?
- 3) Calculer la vitesse initiale en mol/L/min dans la cuve réactionnelle.
- 4) En déduire la concentration catalytique (en U/L et en nkat/L) de la CK dans le sérum.
- 5) La méthode est adaptée sur un automate équipé de cuves réactionnelles dont le trajet optique est de 0,6 cm. Calculer le facteur F de multiplication de la variation d'absorbance par 30 s ($A/30$ s), permettant d'obtenir directement la concentration catalytique d'un sérum en U/L (sachant que le facteur de dilution du sérum dans le milieu réactionnel demeure inchangé). Quelle est la valeur du facteur F' permettant d'obtenir les résultats en nkat/L ?

EPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION - Mai 2012
PROPOSITIONS DE REPONSES

Exercice 2

1)

- enzyme auxiliaire (HK) et enzyme indicatrice (G-6-PD) en large excès ;
- substrats (créatine-phosphate, ADP, glucose, NADP⁺) en concentrations proches de la saturation de leurs enzymes respectives (donc en large excès)
- tampon (pH 6,50).

Seul le NADPH, H⁺ absorbe à 340 nm. Sens de la variation d'absorbance: augmentation.

2) linéarité de la cinétique pendant les 2 minutes prouvant que l'on est bien en conditions de vitesse initiale.

3) $A = 0,123$ par min $\rightarrow 0.123/6300 = 19.2 \cdot 10^{-6}$ mol/L/min

4) Concentration catalytique : $= 0,123/6300 \times 10^6 \times 30 = 585,6$ U/L ou $585600/60$ nmol/L/sec = 9760 nkat/L

5) $F = \frac{2}{6300 \times 0.6} \times 10^6 \times 3.0/0.1 = 15873$ F' = $F/600 \times 1000 = 364550$

EXERCICE N° 2

ÉNONCÉ

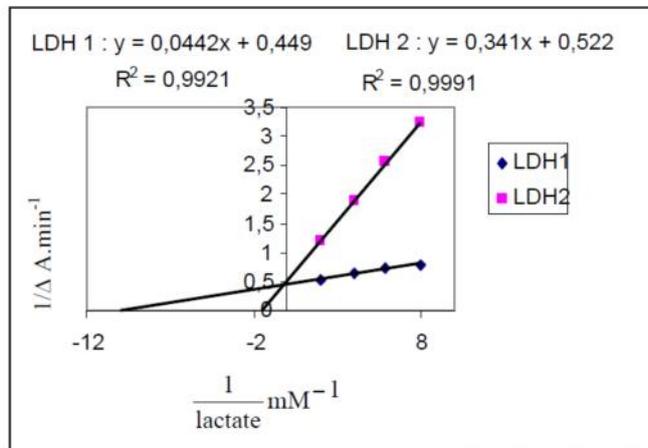
L'analyse de la LDH, par électrophorèse à pH alcalin sur agarose à partir de 10 μL de sérum et révélation spécifique par son activité enzymatique, révèle la présence de 5 isoenzymes dénommées LDH 1, 2, 3, 4, 5, en fonction de leur mobilité de l'anode vers la cathode.

- On élue séparément les protéines correspondant aux deux bandes les plus anodiques (LDH 1 et 2) par 300 μL de NaCl 0,15 M. On évalue la vitesse initiale v_0 de chaque fraction en ajoutant dans une cuve réactionnelle de 1 cm de trajet optique, 5 μL d'éluat et 150 μL d'une solution de substrat contenant des concentrations croissantes de lactate et une concentration saturante en coenzyme. L'expression permettant de calculer la vitesse initiale (en $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$) dans le milieu réactionnel est : $v_0 = K\cdot\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous :

lactate (mM)	LDH 1 $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$	LDH 2 $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$
0,50	1,89	0,84
0,25	1,58	0,53
0,17	1,39	0,39
0,125	1,26	0,31

La représentation des résultats selon l'équation de Michaelis-Menten est la suivante :



A = absorbance

QUESTION N° 1 :

Définir une iso-enzyme et préciser la structure macromoléculaire de chacune des bandes.

QUESTION N° 2 :

Quels sont les paramètres de la LDH que l'on souhaite déterminer dans cette expérience ?

Pourquoi faut-il une concentration saturante en coenzyme ?

Calculer le facteur K (Données : coefficient d'absorbance molaire du coenzyme à la longueur d'onde de lecture = $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

QUESTION N° 3 :

Calculer les K_M et V_{\max} des 2 isoenzymes (on suppose que l'erreur sur les mesures expérimentales est nulle). Quelle est celle qui présente la plus forte affinité pour le lactate ?

En déduire les concentrations catalytiques en LDH 1 et 2 dans la cuve réactionnelle, sachant que dans les conditions conventionnelles la réaction est d'ordre zéro par rapport au coenzyme et que la concentration en lactate est égale à 10 fois son K_M .

QUESTION N° 4 :

En supposant un rendement de 100 % en activité LDH pour l'électrophorèse et l'élution, calculer les concentrations catalytiques sériques de LDH 1 et LDH 2 dans les conditions conventionnelles de la question N° 3 (lactate = $10 K_M$).

1 - Les iso-enzymes sont des enzymes qui catalysent la même réaction mais diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques (notamment constantes cinétiques, pHi...), leurs séquences primaires. Elles sont codées par des gènes présents sur des loci différents. (Les LDH 1 à 5 correspondent aux tétramères : H4 ; H3M ; H2M2 ; HM3 et M4).

2 - Le principe est de déterminer pour les 2 iso-enzymes, le K_m pour le lactate et la V_{max} . Pour ce faire v_o doit être mesurée en fonction de concentrations croissantes de lactate et d'une seule concentration en NAD^+ (en pratique saturante, pour que la réaction soit d'ordre 0 par rapport au NAD^+). v_o est mesurée par la vitesse de production du $NADH$ qui absorbe spécifiquement à 340 nm.

v_o en $mM \cdot min^{-1} = \Delta(NADH) \cdot min^{-1} = (\Delta A \cdot min^{-1}) \times 10^{+3} / \epsilon \cdot l = K \cdot \Delta A \cdot min^{-1}$; $K = 1000 / \epsilon \cdot l = 0,159 \text{ mM}$

3 - LDH 1 : $-1 / K_{M1} = -10,158$ et $K_{M1} = 0,098 \text{ mM}$. $V_{max1} = (1/0,449) \times 0,159 = 0,354 \text{ mM} \cdot min^{-1}$

LDH 2 : $K_{M2} = 0,653 \text{ mM}$ et $V_{max2} = 0,305 \text{ mM} \cdot min^{-1}$.

L'iso-enzyme 1 possède la plus forte affinité.

Les concentrations catalytiques dans la cuve réactionnelle correspondent à $10/11^{\text{ème}}$ de V_{max} , soit 322 U/L pour la LDH 1 et 277 U/L pour la LDH 2.

4 - Dilution au $31^{\text{ème}}$ de l'éluat, 300 μL d'éluat correspondant à 10 μL de sérum: les concentrations catalytiques dans le sérum correspondent à celles de la cuve multipliées par $(31 \times 30) = 930$ soit 299460 U/L pour la LDH 1 et 257610 U/L pour la LDH 2.