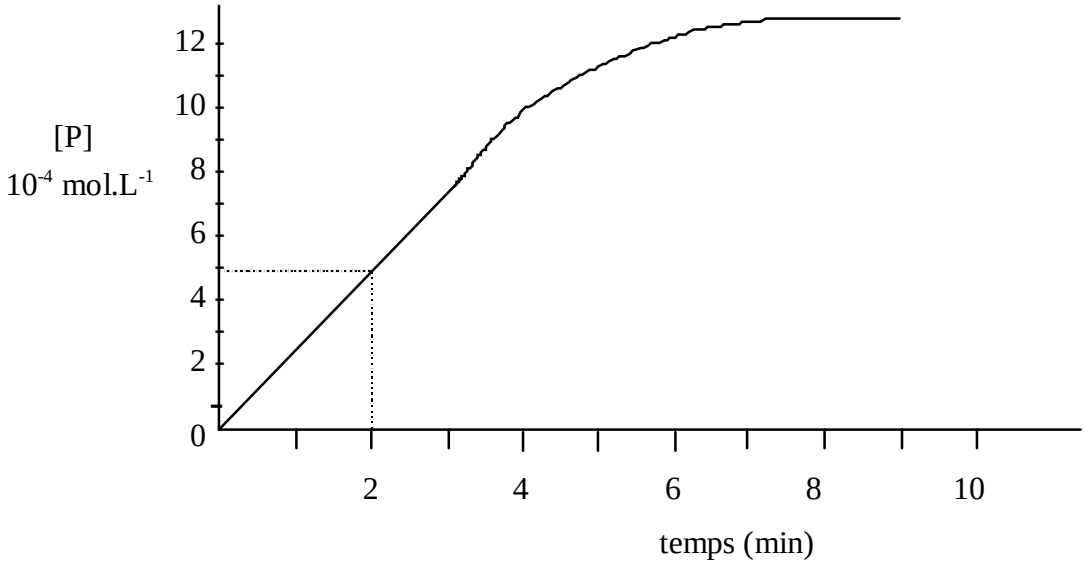
UE-91

Jean François Benoist

Exercice 1

1-Pour l'étude d'une poudre A possédant une activité enzymatique, on en dissout 0,1 g dans une solution tampon convenable et on complète à 100 mL (solution B). Les mesures d'activité enzymatique s'effectuent dans les conditions standardisées pour la définition de l'unité internationale (U) sur une prise d'essai de 0,01 mL de solution B complétée à 10 mL de solution de substrat (S). Ces conditions conventionnelles précisent notamment que la concentration en substrat du milieu d'incubation est de 10 K_m et le temps d'incubation est fixé à 2 min. On donne K_m de l'enzyme pour le substrat = 10^{-3} $mol.L^{-1}$ et kcat ou k_{+2} = $4{,}4.10^{5}$ min^{-1}.



a-D'après l'allure du graphique, quel est le temps maximal de mesure de [P] en condition de vitesse initiale ? Représenter les courbes probables d'une part pour une concentration d'enzyme multipliée par 0,5, 2 et 4 ; $(S)_0$ = cte et d'autre part pour des concentrations en substrat $[S]_0$ = Km, 5 Km, 100 Km ; (Et) = cte.

b-Calculer l'activité enzymatique du milieu d'incubation à partir des données du graphique.

c-En déduire la concentration catalytique de la solution B et de la poudre A.

2-On prépare une solution C à partir de 1 g de A, le reste du protocole étant identique.

a-Quelle est l'activité enzymatique théorique ?

b-Les conditions conventionnelles sont modifiées (S = K_m et le temps d'incubation est fixé à 30 secondes), les autres paramètres étant inchangés. Calculer les concentrations catalytiques des solutions B et C et de la poudre A. Commenter.

3-Calculer la concentration en enzyme $(E)_t$ dans la solution B.

4-La concentration en protéines totales dans la solution B est de 0,25 g/L.

a-Calculer la quantité catalytique spécifique (ou activité spécifique) dans la solution B selon les premières conditions conventionnelles (S = 10 K_m).

b-Sachant que la masse moléculaire de l'enzyme est de 200 kDa, calculer le pourcentage d'impuretés protéiques dans la poudre A.

Exercice 2

On veut doser l'activité LDH (lactate déshydrogénase). Les conditions opératoires sont les suivantes. Introduire dans une cuvette de **1 cm** thermostatée :

- **3 mL** d'une solution de pyruvate **0,63 mM** en tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 ;
- **0,05 mL** d'une solution de NADH **11,3 mM** ;
- **0,10 mL** d'échantillon sérique.

Agiter et lire les absorbances à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min.
Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps (min) :	1	2	3	4	5
DO (340 nm) :	0,922	0,722	0,522	0,342	0,202

1-Calculer les concentrations molaires en $NADH_2$ et pyruvate dans le milieu réactionnel (après addition du sérum) au départ de la réaction (t = 0).

2-En déduire l'absorbance théorique à 340 nm au temps t = 0 (on suppose que le sérum et le pyruvate n'absorbent pas à 340 nm).
On donne : ε molaire du $NADH_2$ à 340 nm = $6{,}3.10^{+3}.mol^{-1}.cm^{-1}.L$

3-En analysant la cinétique (ΔDO/min), préciser et justifier l'intervalle de temps correspondant aux conditions de vitesse initiale v_0.

4-Calculer v_0 (en $mol.L^{-1}.min^{-1}$) dans la cuvette.

5-Expliciter et calculer le facteur F permettant de relier la variation d'absorbance par min (ΔDO/min) à l'activité enzymatique (AE) du sérum exprimée en $U.L^{-1}$.

$$AE = \Delta DO.min^{-1} \times F$$

6-Calculer la concentration catalytique ($U.L^{-1}$) du sérum.

Exercice 3

Lors d'une étape de la purification d'une enzyme, nous sommes partis d'un volume de 100 mL (solution A) contenant 10 g/L de protéines et présentant une concentration catalytique de 20 U/L. A la fin de l'opération, on obtient un échantillon (solution B) de 10 mL contenant 0,625 g/L de protéine et présentant une concentration catalytique de 150 U/L.

1-Quel est le rendement de l'opération en enzyme ?

2-Quelle est l'activité spécifique de la solution A ?

3-Quelle est l'activité spécifique de la solution B ?

4-Quel est le degré de purification ou facteur d'enrichissement ?

Exercice 4

Une expérience porte sur une solution d'enzyme E agissant sur un substrat S. Les mesures d'activités sont effectuées dans les conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité internationale. Parmi ces conditions, la concentration en substrat du milieu d'incubation est fixée à [S] = 10 K_m = 10.10^{-4} $mol.L^{-1}$. L'activité enzymatique de la solution mesurée dans les conditions conventionnelles donne :

$v_0 = 5.10^{-6}$ $mol.\ min^{-1}.L^{-1}$.

1-Calculer la V_{max} de cette solution d'enzyme

2-Sur cette solution d'enzyme nous devons contrôler les effets sur l'activité enzymatique d'un inhibiteur compétitif présent dans le milieu d'incubation à une concentration de [I] = 2.10^{-5} $mol.L^{-1}$. Le K_i de l'enzyme pour l'inhibiteur = $0{,}5.10^{-5}$ $mol.L^{-1}$.

a-Quel est l'effet prévisible de l'inhibiteur sur K_m et V_{max} ?

b-Calculer la vitesse apparente (v_{app}) prévisible dans les conditions conventionnelles.

c-Calculer le pourcentage d'inhibition pour cette concentration en substrat.

d-Quelle est l'évolution prévisible de ce pourcentage d'inhibition quand on augmente la concentration en substrat du milieu d'incubation ?

3-Généraliser la question 2d à un inhibiteur non compétitif et incompétitif.

Exercice 5

On souhaite doser un substrat par voie enzymatique en mode cinétique (mesure de la vitesse initiale).

1-Quel doit être l'ordre de la réaction par rapport à [S]. En déduire sur la courbe de Michaelis le domaine de la courbe concerné par cette application.

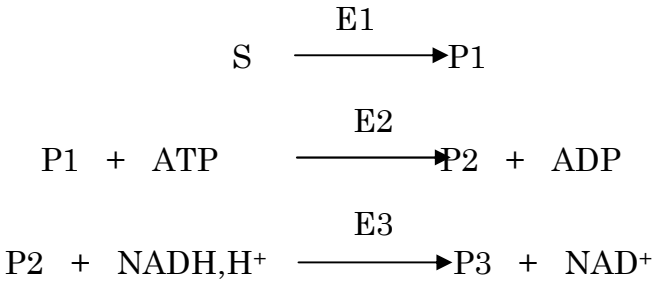
2-Sachant que le Km de l'enzyme pour S est de 10^{-4} M, quelle sera la concentration maximale de S dosable par cette technique (on considère $[S]_0$ négligeable par rapport au Km lorsqu'il est ≤ 10 % de sa valeur).

3-Quelle sera l'expression de la disparition de S en fonction du temps ?

4-En pratique v_0 n'est pas mesurable à t = 0. On mesure plutôt S_1 et S_2 à deux temps t_1 et t_2 (méthode en temps fixé) et on calcule - Δ(S). Démontrer l'expression $(S)_0$ en fonction de Δ(S). Sachant que (S) obéit à la loi de Beer-Lambert, donner une expression de $[S]_0$ en fonction de la variation d'absorbance.

Exercice 6

On veut doser un substrat S dans le plasma par une méthode cinétique enzymatique selon le schéma suivant :



1-Quel doit être l'ordre de la réaction catalysée par E1 par rapport à S ?

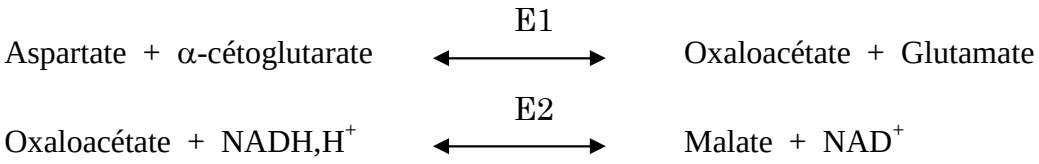
2-Préciser les composés limitants et ceux qui doivent être en excès (par rapport au Km et à la concentration en enzyme E1).

3-Les concentrations pathologiques de S peuvent atteindre 60 mmol/L. Sachant que l'on ajoute 0,735 mL de milieu réactionnel à un volume d'échantillon plasmatique de 0,015 mL, quelle est la valeur minimale du Km de E1 ? (On veut (S) ≤ 0,1 Km).

4-La méthode est calibrée par un étalon à 5 mmol/L qui est dosé dans les mêmes conditions que le substrat. Sachant que les Δ DO pour S et l'étalon sont respectivement de - 0,015 et - 0,020, calculer la concentration plasmatique de S.

Exercice 7

On veut doser l'activité enzymatique sérique de l'ASAT (E1) selon le schéma réactionnel suivant :



Le sérum (20 µL) est préincubé 10 min à 37°C avec 0,2 mL de milieu réactionnel. Puis 20 µL d'α-cétoglutarate (144 mmol/L) sont ajoutés. La variation d'absorbance à 340 nm est de - 0,08/min.

1-Quel est le rôle de E2 et quelle doit être sa concentration relative par rapport à E1 ?

2-Le milieu réactionnel contient notamment du pyridoxal-5'-phosphate et de la LDH. Quels sont leurs rôles ?

3-Le Km de l'ASAT pour l' α-cétoglutarate = 4 x 10^{-5} mol/L. Quel est le taux de saturation de l'ASAT pour ce substrat ?

4-Calculer la concentration catalytique sérique de l'ASAT, sachant que $\varepsilon_M = 6,3\ 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1}.

Exercice 8

On se propose de doser l'urée plasmatique d'un malade par méthode cinétique enzymatique en temps fixé. Le protocole de l'analyseur est le suivant :

- au temps t = 0 seconde, 4 µL d'échantillon plasmatique sont introduits dans la cuve de lecture et 10 secondes après 250 µL de réactif R1 (tampon CAPSO 5 mmol/L, pH 9,65 ; NADH ≥ 0,23 mmol/L) ;

- au temps t = 90 secondes, 150 µL du réactif déclenchant R2 (tampon BICINE : 1000 mmol/L, pH 7,6 ; uréase ≥ 7,2 U/mL ; GLDH ≥ 0,390 U/mL ; α–cétoglutarate ≥ 8,3 mmol/L.

Les lectures à 340 nm sont effectuées toutes les 20 secondes. Les deux points de lecture pour le calcul de la concentration en urée plasmatique sont effectuées à 180 et 260 secondes.

Les variations d'absorbances pour le plasma à doser et pour un étalon à 15,9 mmol/L traité dans les mêmes conditions sont respectivement de 0,37 et 0,08 unités d'absorbance.

1-Ecrire la séquence réactionnelle du dosage.

2-Calculer l'absorbance théorique minimale à 340 nm dans la cuve après addition des réactifs R1 et R2 (ε molaire du NADH à 340 nm = $6,3.10^3$ M^{-1}cm^{-1}).

3-Calculer la concentration plasmatique d'urée chez le malade.

4-La concentration en substrat étant trop élevée, l'analyseur refuse de valider le résultat. Quelle en est la raison et quelle devrait être la valeur minimale du Km de l'uréase pour que le résultat soit valide (on considère que la réaction est d'ordre 1 par rapport à S pour [S] < 0,1 Km).

5-Un contrôle effectué automatiquement par l'analyseur sur un volume réduit d'échantillon plasmatique (2 µL) affiche une variation d'absorbance de 0,20 validée par l'analyseur. Calculer la concentration d'urée rendue par l'analyseur.

Exercice 9

On se propose de doser le lactate plasmatique par voie enzymatique selon les réactions suivantes :

$$\text{Lactate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{pyruvate} + NADH + H^+$$

$$\text{Pyruvate} + \text{glutamate (excès)} \xrightarrow{\text{ALAT}} \text{alanine} + \alpha\text{-cétoglutarate}$$

Quatre µL de plasma sont introduits dans la cuve réactionnelle d'un analyseur puis successivement 200 µL de réactif R1 à 10 sec, 50 µL de réactif R2 à 1 min 30 ; 50 µL de réactif R3 à 5 min. Une première lecture est effectuée à 340 nm à 5 min et une deuxième à 10 min. La variation d'absorbance lue entre 5 et 10 min est de 0,378.

1- S'agit-il d'un dosage en mode cinétique ou en point final ?

2- Sachant que dans les conditions standard à pH 7, l'équilibre est en faveur du lactate, commenter le rôle de l'ALAT et du tampon pH 10.

3-Sachant que le coefficient d'extinction molaire du $NADH,H^+$ à 340 nm et de $6,3 . 10^{+3}$ mol^{-1} l^{+1} cm^{-1}, calculer la concentration en mmol/L du $NADH,H^+$ libéré dans le milieu réactionnel.

4-En déduire la concentration du lactate plasmatique du malade.

R1	tampon carbonate pH 10 ; 0,5 M ; glutamate 63 mmol/L
R2	NAD 4,6 mmol/L
R3	LDH > 1632 U/mL ; ALAT > 102 U/mL

Exercice 10 : supprimé

Exercice 11

Le protocole de dosage en point final des bicarbonates plasmatiques sur un analyseur est le suivant :

- L'automate réalise une prédilution au $1/5^{ème}$ du plasma, puis prélève 4 µL de cette prédilution pour les introduire dans une cuve réactionnelle (t = 0) contenant 80 µL de réactif R1 [tampon Tris 25 mM pH 6,5 ; phosphoénolpyruvate (PEP) 6,3 mM ; NADH 0,45 mM ; PEP Carboxylase (PEPC) 200 U/L ; Malate Deshydrogénase (MDH) 400 U/L ; Mg^{2+} 8 mM]. Il est précisé que la PEPC catalyse la carboxylation (à partir du bicarbonate) du PEP avec libération d'oxaloacétate et de phosphate.

- Les variations d'absorbance ΔA lues dans une cuve de 1 cm de trajet optique entre les temps 10 sec et 5 min, sont respectivement de – 0,799 ; - 1,412 ; - 0,191 pour un échantillon plasmatique P à doser, pour un étalon E à 30 mM et un blanc réactif BR (4 µL d'eau déionisée + 80 µL de R1) traités dans les mêmes conditions.

1-Ecrire les réactions principales et indicatrices. Quel est le principe d'une réaction en point final et quelles sont les conditions opératoires à respecter pour optimiser le dosage ? Comment assure-t-on l'irréversibilité de la réaction principale ?

2-Quelle est l'absorbance théorique à 340 nm dans la cuve à t = 0 ? (on considère que seul le NADH absorbe à cette longueur d'onde : E molaire = 6300 $M^{-1}cm^{-1}$).

3-En supposant que la réaction soit totale à t = 5 min, quelle serait dans la cuve la fraction du NADH consommée par l'étalon et l'absorbance théorique résiduelle à 340 nm compte tenu de celle du blanc réactif (- 0,191) ?

4-Les valeurs de Km de la PEPC pour ses deux substrats sont respectivement de 5.10^{-6} M pour le bicarbonate et 3.10^{-5} M pour le PEP dans les conditions opératoires. Commenter ces valeurs par rapport aux concentrations attendues pour ces deux substrats dans le milieu réactionnel.

5-Calculer la concentration en bicarbonates dans l'échantillon plasmatique et donner l'expression de la formule permettant de la calculer.

NB : les questions 1, (2 + 3), 4 et 5 peuvent être traitées indépendamment.

Exercice 12 :

L'ammonium plasmatique est dosé sur un automate par l'α-cétoglutarate déshydrogènase (GLDH) catalysant la séquence réactionnelle suivante :

$$\alpha\text{-cétoglutarate} + NH4^{+} + NADPH \xrightarrow{GLDH} \text{L-glutamate} + NADP^{+} + H_2O$$

L'automate introduit successivement dans la cuve réactionnelle 20 µL d'une prédilution au tiers de l'échantillon plasmatique dans le réactif R1, 67 µL de réactif R1 (tampon triéthanolamine 151 mM, pH 8,6 ; α-cétoglutarate 16,6 mM ; ADP > 1,2 mM), 17 µL de reactif R2 (NADPH 458 µM ; GLDH > 24,3 U/mL dans le réactif R1). Les variations d'absorbance (ΔA) dans la cuve réactionnelle sont lues à 340 nm aux temps t_1 = 5,3 min et t_2 = 7,1 min après l'addition du réactif R2.

1-Quelle serait l'absorbance théorique à 340 nm et à t = 0 min ? E molaire du NADPH à 340 nm = 6300 $M^{-1}cm^{-1}$; on suppose que seul le NADPH absorbe à 340 nm.

Le Km de la GLDH pour l'ion ammonium dans les conditions opératoires est de 8 mM. Par ailleurs la droite d'étalonnage est établie à partir d'un seul étalon à 117 µM en NH_4Cl, traité comme un échantillon plasmatique et dont la ΔA (à 340 nm entre t_1 et t_2) = - 0,0095.

2-Exprimer en unités Km la concentration de cet étalon dans la cuve réactionnelle.

3-En déduire le principe de la méthode de dosage de l'ion ammonium par cette voie enzymatique.

La concentration en substrat à doser $[S]_0$ est calculée par la relation : $[S]_0 = K \cdot \Delta A$

4-Donner l'expression mathématique de K et sa valeur numérique.

5-La variation d'absorbance ΔA mesurée pour le plasma d'un malade est de – 0.01597. En déduire la concentration en ammonium.

NB : les questions 1,2 et 5 peuvent être traitée indépendamment.

Exercice 13

La LDH (lactate déshydrogènase) est un hétérotétramère de 140.000 Da. Lorsque la LDH est à une concentration de **1 µM**, la concentration catalytique mesurée dans des conditions conventionnelles de **vitesse maximale** est de **60.10^3 U/L**. La réaction catalysée est une réaction Bi-Bi ordonnée, le NADH étant le premier substrat.

1-Calculer la valeur de la constante catalytique $\mathbf{k_{cat}}$ de l'enzyme. Que devient cette valeur pour une concentration en LDH de 4 µM (les autres paramètres demeurant inchangés) ?

2-Définir le katal et exprimer la concentration catalytique en kat/L.

3-Quelle serait la valeur de cette concentration catalytique (en U/L) si l'expérimentateur avait choisi pour définir ses conditions conventionnelles une concentration en NADH saturante et une concentration en pyruvate égale à **3 Km** ?

4-En déduire le poids de LDH (en µg) correspondant à 1 U pour chacune de ces conditions conventionnelles.

5-La vitesse initiale de la solution de LDH à 1 µM mesurée en présence d'une concentration saturante en NADH et d'une concentration en pyruvate de 0,8 mM est de 20.000 µM/min. Calculer le Km de la LDH pour le pyruvate.

6-La concentration catalytique en LDH déterminée (en conditions conventionnelles de Vmax) dans le sérum d'un malade après infarctus du myocarde est de 3000 U/L. En déduire les concentrations molaires et pondérales (g/L) en LDH dans ce sérum. Quelle est la fraction de la LDH par rapport aux protéines totales (70 g/L) chez ce malade ?

NB **:** les questions 1, 2, 3, 5 et 6 sont indépendantes.

Exercice 14

La glucokinase (GK) est purifiée à partir d'un broyat de foie. Après centrifugation on obtient un extrait brut A de 400 mL dont les concentrations catalytiques (mesurées en conditions conventionnelles) et en protéines totales sont respectivement de 4 U/L et 80 g/L.
Après la dernière étape de purification on obtient une solution B de volume 10 mL, de concentration catalytique 120 U/L et contenant 6 g/L en protéines totales.

1-Calculer pour la GK le rendement de la purification, les activités spécifiques des solutions A et B et le degré de purification dans la solution B.

L'analyse de la solution B en électrophorèse (PAGE-SDS et conditions réductrices) révèle la présence d'une seule bande de masse moléculaire relative (Mr) à 35 kDa. On veut étudier les propriétés catalytiques de la GK sur une solution de 1 mL de B diluée au $1/10^{ème}$ dans un tampon de même composition que celui des conditions conventionnelles à l'exception de la concentration en substrat (glucose) qui est variable. Les vitesses initiales v_0 mesurées pour des concentrations en glucose dans le milieu réactionnel de 10 et 30 mM, sont respectivement de 7 et 10,5 µM/min.

2-Représenter ces résultats en représentation d'Eadie- Hofstee. En déduire le Km de la GK pour le glucose et la Vmax.

3-Tracer, dans le même type de représentation graphique, le tracé probable que l'on obtiendrait pour une solution B diluée au $1/50^{ème}$; les autres conditions expérimentales étant conservées.

4-Calculer en unités Km (selon la relation [S] = a.Km) et en mol/L la concentration en glucose définie pour les conditions conventionnelles.

5-A partir des résultats expérimentaux ci-dessus peut-on estimer la valeur de la constante catalytique de la GK et si oui quelle serait cette valeur ?

Exercice 15 ***

On se propose d'étudier la cinétique de la succinate déshydrogénase (SDH) en présence d'une concentration fixe d'enzyme, d'une concentration saturante en FAD et de concentrations croissantes en succinate. Les autres paramètres de la réaction (pH, force ionique etc) sont parfaitement définis.

Les vitesses initiales v_0 mesurées pour chaque concentration en succinate sont reportées graphiquement selon la représentation de **Lineweaver et Burk**. Elles permettent d'obtenir une droite de régression d'équation : **$y = 1,6\ x + 4,0.10^4$**.

NB : les paramètres de cette droite sont obtenus à partir de concentrations en succinate exprimées en mmol/L et de vitesses initiales (mesurée par la consommation en succinate) exprimées en µmol/L/min.

1-Définir pour cette droite les variables y et x (en précisant les unités). Quelles sont les significations de la pente et des intersections avec les axes y et x ? Calculer Km et Vmax.

La même expérience que précédemment est répétée en présence d'un inhibiteur de la SDH : le malonate introduit à une concentration de 22,5 µM. L'équation de la nouvelle droite de régression dans la représentation de Lineweaver et Burk est : **$y = 2,8\ x + 4,0.10^4$**.

2-Calculer les éventuelles variations de Km et Vmax.

En déduire le mode d'action de l'effecteur sur l'enzyme.

Calculer la constante de dissociation Ki du malonate pour la SDH.

Démontrer l'équation exprimant pour ce type d'inhibiteur le degré d'inhibition de la vitesse initiale. Extraire de cette expression la concentration en inhibiteur (I_{50}) pour un degré d'inhibition de 0,5 (soit 50 %). Calculer cette concentration pour (S) = Km.

Exercice 16

Chez l'homme le métabolisme de l'éthanol (C_2H_5OH) en acétaldéhyde puis en acétate est catalysé par l'alcool déshydrogènase (ADH).

Lors d'une intoxication par le méthanol (CH_3OH), la conversion du méthanol en formaldéhyde (aussi catalysée par l'ADH), peut être à l'origine d'une cécité ou même de la mort du patient. L'éthanol est dans cette circonstance utilisé comme substrat compétitif ou **inhibiteur compétitif** du catabolisme toxique du méthanol par l'ADH.

Un adulte de 65 kg a ingéré une dose (létale) de 50 mL de méthanol pur.

1-Calculer la concentration molaire en méthanol dans le secteur liquidien de l'organisme (on considère que le secteur liquidien représente 60 % du poids d'un adulte, que l'éthanol et le

méthanol diffusent complètement dans ce secteur et que la densité de ces 2 alcools est de 0,790 g/mL). Exprimer cette concentration en unités Km.

On administre comme antidote de l'éthanol absolu (100 %).

2-Calculer la concentration en éthanol (en unités Ki et en mol/L) permettant de réduire l'activité enzymatique (vitesse initiale) de l'ADH pour le méthanol à 3 % de sa valeur originelle.

3-Calculer le volume d'éthanol (mL) à administrer pour obtenir cette concentration (l'éthanol et le méthanol se répartissent dans le même secteur liquidien).

Données :

ADH: **Km** pour le méthanol = 10 mM ; **Ki** pour l'éthanol = 1 mM

Masses molaires : éthanol = 46 g ; méthanol = 32 g

Exercice 17 : ***

On veut déterminer l'activité enzymatique de la LDH plasmatique (EC.1.1.1.27).

L'analyseur prélève successivement 10 µL de plasma, puis après 10 s 250 µL de réactif R1 (tampon pH 7,2, contenant du NADH 0,2 mmol/L) puis après 1,5 min d'incubation 50 µL de réactif R2 (pyruvate 1,6 mmol/L). Les lectures d'absorbance à 340 nm sont effectuées aux temps 3 et 5 min après ajout du réactif R2.

1-Quels sont le principe du dosage et la signification du premier chiffre de la numérotation enzymatique (EC.1….) ?

2-Quelles sont les valeurs attendues pour l'absorbance à 340 nm immédiatement après ajout des réactifs R1 puis R2 ? On considère que seul le NADH (coefficient d'extinction molaire à 340 nm ε_M.= 6,3 10^3 mol/L/min) absorbe à cette longueur d'onde.

3-L'analyseur calcule la concentration catalytique (U/L) dans le plasma par la formule (ΔDO/min).x (F). Calculer la valeur du facteur F.

4-La variation d'absorbance lue entre 3 et 5 min est de 0,122. Calculer la concentration catalytique du plasma en U/L. Quelle serait cette valeur en nkat / L ?

Exercice 18 : ***

Une enzyme est purifiée à partir de 2 litres d'un milieu de culture **(A)** présentant une concentration catalytique en enzyme de 20000 U/L et une concentration en protéines totales de 12,5 g/L. Après une série d'étapes de purification on obtient en final 50 mg d'une poudre

lyophilisée **(B)** présentant une concentration catalytique en enzyme de 240 U/mg de poudre et une concentration en protéines totales de 30 mg/100 mg de poudre.

Q1 – Quelle est la teneur en impuretés non protéiques de la poudre ?
Q2 – Calculer

- le rendement de la purification en quantité catalytique
- les activités spécifiques avant et après purification
- le degré de purification de l'enzyme dans la poudre (B)

Exercice 19 :

On veut optimiser la détermination de l'activité enzymatique d'une enzyme à un substrat. Au préalable on a déterminé les conditions optimales d'incubation (choix du tampon, molarité, pH, température etc…) ainsi que le K_M pour le substrat choisi = 5.10^{-4} M. On impose que la vitesse initiale v_0 soit au moins égale à 90 % de la vitesse initiale maximale.

- Calculer la concentration minimale en substrat permettant d'atteindre cet objectif.
- Exprimer votre résultat en unités K_M.
- Cette concentration minimale est-elle dépendante de la concentration en enzyme ? Justifier votre réponse.

Exercice 20 : ***

La glutamate déshydrogénase (GLDH) est purifiée à partir de 400 mL d'un homogènat de foie (A) contenant 120 g de protéines totales et une quantité catalytique en GLDH de 25000 U. Après plusieurs étapes de purification on recueille 1 litre d'une solution (B) contenant 5 g de protéines totales et une concentration catalytique de 8500 U/L.

- Proposer en quelques lignes une démarche expérimentale permettant de mesurer la concentration catalytique de la GLDH à purifier (le signal mesuré correspond à la consommation du NADH).
- Calculer les rendements de la purification en protéine et en quantité catalytique.
- Calculer les activités spécifiques des solutions A et B et le degré de purification de la GLDH dans la solution B.
- Proposer une expérience simple permettant d'analyser la pureté de la solution B et de révéler spécifiquement la GLDH.

Exercice 21 :

Pour mesurer la concentration d'un substrat S dans un liquide biologique par cinétique enzymatique en temps fixé on mesure par absorbance le substrat consommé exactement 15 secondes (t_1) et 100 secondes (t_2) après le début de la réaction. L'analyseur fournit dans ces

conditions deux valeurs numériques M1 = 0,890 et M2 = 0,750 reflétant la concentration en substrat consommé dans le milieu réactionnel.
Une solution étalon du substrat à 10 µM est traitée dans les mêmes conditions opératoires. Soient E1 = 0,450 et E2 = 0,130 les valeurs lues par l'analyseur aux deux temps de la cinétique. On a par ailleurs vérifié que dans le milieu réactionnel la concentration en substrat est dans tous les cas inférieure à 0,1 K_M.

- Quel est le principe de la mesure de la concentration en substrat dans les conditions opératoires décrites ci-dessus ?
- Calculer la concentration de S dans le liquide biologique.
- Quelle est l'expression du facteur de proportionnalité reliant la concentration en substrat à doser et la variation d'absorbance lue aux deux temps t_1 et t_2 de la cinétique ?

Exercice 22 ***

On veut déterminer le K_M d'une enzyme pour son substrat S. Pour ce faire, on mesure dans des conditions expérimentales bien définies la vitesse initiale v_0 de la réaction en fonction de concentrations croissantes en substrat.

- Q 1. Quels sont les paramètres physico-chimiques de la réaction qui doivent être définis pour cette expérience ?

Parmi les nombreuses mesures effectuées 3 couples de valeurs considérées comme très significatives sont reportés dans le tableau ci-dessous :

(S) mM	2	5	10
V_0 µM/min	3	6	9

- Q 2. L'expérimentateur très soigneux mais étourdi ne dispose que d'une calculette pour interpréter ses résultats pour lesquels il postule que l'erreur expérimentale est négligeable. Calculez le K_M et la Vmax de l'enzyme.

L'enzyme est maintenant incubée en présence de 0,1 mM d'un composé C et dans les mêmes conditions opératoires que ci-dessus. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous :

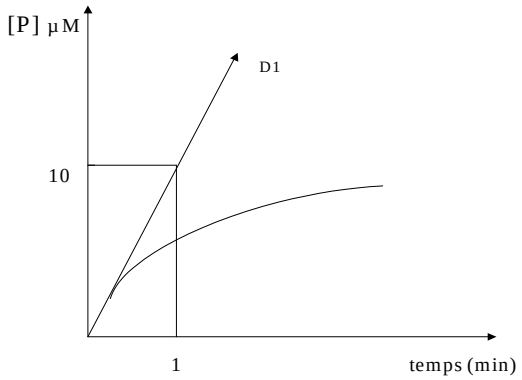
(S) mM	2	5	10
V_0 µM/min	2,57	4,5	6

- Q 3.
  - Calculez le K_M et la Vmax de l'enzyme en présence du composé C.
  - En déduire le mode d'action le plus probable du composé C
  - Calculez la constante de dissociation du composé C pour l'enzyme

Exercice 23

A

Le graphe ci-dessous représente la cinétique de libération du produit quand on ajoute 10 U d'une enzyme à comportement michaèlien dans un 1 L de milieu réactionnel bien défini contenant une concentration en substrat [S] = 3 K_M (conditions conventionnelles définissant l'unité).



Q1. Que représente la droite D1 et quelle est la valeur de sa pente (avec les unités) ?
Q2. Quelle est la valeur prévisible de Vmax ? Représentez la droite correspondante D2.
Q3.Tracez la droite D3 correspondant à la même expérience réalisée avec 4 U d'enzyme et [S] = 3 K_M.

B

La réaction d'une enzyme à un substrat est représentée par :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \left[\rightleftharpoons EP \right] \xrightarrow{k_2} E + P$$

Q1. Quelles sont les unités des constantes de vitesse du schéma ci-dessus ?

Q2. Exprimez K_M et le rapport $[ES]/[E]_t$ en fonction des symboles du schéma ci-dessus.
$[E]_t$: concentration totale en enzyme

Pour cette enzyme l'unité de quantité catalytique **U** est définie dans des conditions conventionnelles correspondant à un grand excès en substrat (milieu réactionnel A correspondant à des conditions de Vmax).

On incube deux quantités identiques de 5 U de cette enzyme, d'une part dans 250 µL de milieu A et d'autre part dans 250 µL d'un milieu B reproduisant les mêmes conditions conventionnelles que le milieu A à l'exception de la concentration en substrat = $4{,}5.10^{-2}$ M.

Q3. Calculez les vitesses initiales prévisibles dans 1 litre de chacun des milieux A et B Sachant que $K_M = 5.10^{-3}$ M.

Exercice 24

La réaction d'une enzyme à un substrat en conditions de vitesse initiale est représentée par le schéma ci-dessous :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Q1. Ecrire la partie du schéma correspondant à l'hypothèse de l'équilibre rapide

Q2. Dans le cas de l'hypothèse de l'état stationnaire :

- écrire l'équation v_f de formation du complexe ES
- écrire l'équation v_d de disparition du complexe ES
- exprimez [ES] en fonction des éléments de cette équation et en déduire l'expression de la constante de Michaelis

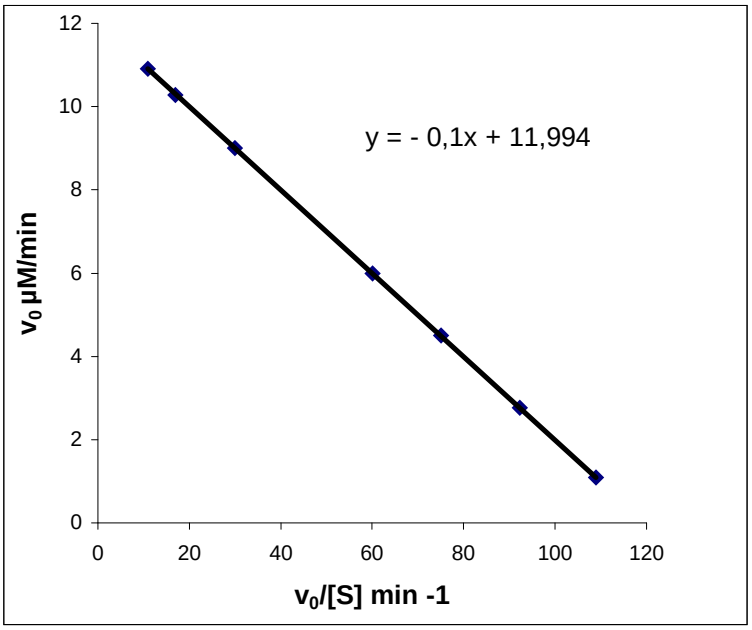
Q3. Une solution de cette enzyme est incubée dans les conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité **U** d'activité enzymatique. La concentration en substrat est de 9 mM et la vitesse initiale mesurée est de 4,84 µM par minute (le K_M de l'enzyme est de 3.10^{-4} M).

- calculez la concentration catalytique de l'enzyme dans la solution. Exprimez cette concentration en unités **katal**
- Calculez la vitesse maximale dans la solution enzymatique
- Calculez la vitesse initiale et la vitesse maximale en présence d'une concentration à 4,5 mM d'un inhibiteur compétitif de l'enzyme (Ki = 0,5 mM)

Exercice 25 ***

Une solution **A** est préparée en dissolvant une quantité d'enzyme correspondant à 9 unités (**U)** dans un litre de tampon reproduisant les conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité à l'exception du substrat qui est ajouté extemporanément.

Q1. Quelle est la vitesse initiale prévisible de la solution A dans les conditions conventionnelles ?
Sur cette solution A on effectue un grand nombre
de mesures de vitesses initiales en l'incubant en présence de concentrations croissantes en substrat exprimées en mM. Les résultats sont reportés sur le graphique ci-dessous :



Q2. Quelle est le nom de cette représentation graphique ? Donner l'équation de la droite et les expressions de la pente et des intersections avec les axes. En déduire les valeurs de K_M et Vmax.

Q3. En déduire la concentration en substrat correspondant aux conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité d'enzyme. Exprimez cette concentration en unités K_M.

On recommence la même expérience mais avec une solution **B** de la même enzyme de concentration catalytique 3 U/L

Q4. Calculez la Vmax et le K_M de cette solution **B**. Tracer sur le graphique ci-dessus la droite correspondant à cette solution.

Exercice 26

On cherche à déterminer la concentration catalytique d'une poudre P contenant une enzyme. On prépare une solution A en dissolvant 0,5 g de poudre dans 10 mL de tampon. La concentration catalytique de la solution A est déterminée sur un milieu réactionnel composé de 1 mL de solution A additionné de 4 mL d'une solution de substrat. La concentration en substrat dans le milieu réactionnel (correspondant aux conditions conventionnelles retenues

pour définir l'unité d'activité enzymatique) est de 2,5 mM. Le K_M de l'enzyme pour le substrat choisi est de 5 mM. La vitesse initiale mesurée dans le milieu réactionnel est de 20 µM/min.

Q1. Calculez la vitesse initiale maximale (Vmax) dans le milieu réactionnel

Q2. Calculez, en conditions de Vmax, la vitesse initiale de la solution A

Q3. Calculez la concentration catalytique en enzyme dans un litre de solution A et dans 1 kg de poudre P.

Exercice 27

Un liquide biologique A contient une enzyme E. La concentration en protéines du liquide A est de 40 mg/L. L'activité enzymatique du liquide A est mesurée dans un milieu réactionnel constitué de 1 mL du liquide A et de 3 mL d'une solution tamponnée contenant un substrat S1 à une concentration de 5 mmol/L (le K_M de E pour S1 est de 10^{-4} mol/L). La vitesse initiale mesurée dans le milieu réactionnel est de 50 µmol/L/min.
NB : il est précisé que la réaction catalysée par E est une réaction mono-substrat et que l'enzyme possède pour ce substrat un seul site de fixation

Q1. Calculez dans le milieu réactionnel le taux d'occupation par S1 des sites de fixation du substrat sur l'enzyme (ce taux est plus communément désigné dans la formulation de Michaelis par le rapport $(ES)/(E)_t$.

Q2. En déduire la vitesse maximale Vmax dans le milieu réactionnel.

Q3. Calculez la concentration catalytique (les quantités catalytiques seront exprimées en unités U et en nanokatals) de l'enzyme dans le liquide biologique A (on considère que les conditions conventionnelles sont celles du milieu réactionnel).

Q4. En déduire l'activité spécifique de l'enzyme dans le liquide A (les quantités catalytiques seront exprimées en unités U).

Un deuxième substrat S2 est disponible pour déterminer l'activité enzymatique de l'enzyme. Comparé à S1, ce substrat S2 possède un K_M de $3{,}75.10^{-4}$ mol/L et une constante catalytique kcat deux fois plus élevée.

Q5. Quelle serait la vitesse initiale mesurée dans le milieu réactionnel avec le substrat S2 ?

Exercice 28 (prévoir une feuille de papier millimétré)

Une solution A d'enzyme E présente une concentration catalytique de 1000 U/L (concentration établie dans des conditions conventionnelles avec une concentration saturante de substrat). La concentration totale en protéines est de 10 g/L
Pour effectuer des mesures de cinétique enzymatique on opère dans les conditions suivantes : 1 mL de solution A est mélangé à 1 mL de solution B contenant le substrat S de l'enzyme à une concentration de 0,2 mmol/L. La quantité de produit P apparue dans le milieu réactionnel (1 mL de A + 1 mL de B) est de 0,5 µmol après 1 minute , 1 µmol après 2 minutes et 1,2 µmol après 3 minutes.

Q1. Quelle est la vitesse initiale dans le milieu réactionnel ?

Q2. Quelle serait la vitesse initiale dans le milieu réactionnel si la concentration en substrat était saturante ?

Q3. Calculez le K_M de l'enzyme pour le substrat. A partir des résultats des questions 2 et 3 tracez la représentation de Lineweaver et Burk.

Q4. Calculez l'activité spécifique de la solution A.

Un inhibiteur de E de type uncompétitif et de Ki = 20 µmol/L est introduit dans le milieu réactionnel à une concentration finale de 40 µmol/L.

Q5. Calculez les K_M apparent et/ou Vmax apparent en présence de l'inhibiteur. Tracez sur le même graphe que ci-dessus la représentation de Lineweaver et Burk en présence de l'inhibiteur

Exercice 29

On cherche à déterminer la concentration catalytique d'une poudre P contenant une enzyme E. On obtient une solution A en dissolvant 0,1 g de cette poudre dans 10 mL d'un tampon. La concentration en protéines de A est de 150 mg/L. L'activité enzymatique de la solution A est déterminée dans un milieu réactionnel constitué de 1 mL de solution A et de 1 mL d'une solution B contenant le substrat à une concentration de 0,8 mmol/L.
La vitesse initiale mesurée dans le milieu réactionnel avec une concentration en substrat égale à 4 K_M est de 600 µmol/L/min.

Q1. Quelle serait la vitesse initiale dans le milieu réactionnel en conditions saturantes de substrat (conditions conventionnelles) ?

Q2. Quelle est la concentration catalytique de E dans la solution A et dans la poudre P (conditions conventionnelles) ?

Q3. Quel est le K_M du couple enzyme-substrat ?

Q4. On refait la même expérience que celle décrite ci-dessus mais en pesant 0,2 g de poudre P et en introduisant dans la solution B un inhibiteur compétitif de E à une concentration égale à 6 fois son Ki. Le reste de l'expérience est strictement identique.

Quelle sera la vitesse initiale mesurée dans ces conditions dans le mélange réactionnel ?

Exercice 30 :

On souhaite mesurer la concentration catalytique d'une enzyme dans un milieu réactionnel obtenu par mélange de 2 mL d'une solution **A** de l'enzyme et 1 mL d'une solution tamponnée **B** contenant le substrat spécifique de cette enzyme.
La solution **A** est obtenue en dissolvant 0,5 g de poudre d'enzyme purifiée dans 20 mL d'eau déionisée. La concentration en protéines de la solution A est de30 mg/L.
La solution **B** est obtenue en dissolvant le substrat **S** à une concentration de 6.10^{-3} mol/L de telle sorte que la concentration finale de **S** dans le milieu réactionnel soit de 8 K_M.
Après démarrage de la réaction la cinétique de libération du produit P est de

- 80 µmol/L à 30 secondes
- 160 µmol/L à 1 minute
- 240 µmol/L à 90 secondes
- 300 µmol/L à 2 minutes

Q1. Calculez le K_M du couple enzyme-substrat

Q2. D'après ces données précisez l'intervalle de temps correspondant aux conditions de vitesse initiale et calculez cette vitesse initiale dans le milieu réactionnel.

Q3. Quelle serait la Vmax dans le milieu réactionnel si la concentration en substrat dans ce même milieu était saturante ?

Q4. En supposant que dans le milieu réactionnel les conditions conventionnelles choisies pour déterminer la concentration catalytique soient des conditions saturantes en substrat, calculez la concentration catalytique et l'activité spécifique de **E** dans la solution **A**.

Q5. Calculez l'activité spécifique de E dans la poudre purifiée ainsi que la teneur de cette poudre en protéines.

Q6. On introduit dans le milieu réactionnel de la question 4 un inhibiteur incompétitif à une concentration finale égale à 3 fois sa constante de dissociation. Quelles en seront les conséquences sur K_M et Vmax ?

Exercice 31

On souhaite mesurer la concentration catalytique d'une enzyme **E** dans un milieu réactionnel obtenu par mélange de 1 mL d'une solution **A** de l'enzyme et 1 mL d'une solution tamponnée **B** contenant le substrat spécifique **S** de cette enzyme.
La solution **A** est obtenue en dissolvant 1 g de poudre d'enzyme purifiée dans 10 mL de tampon approprié. Les concentrations en enzyme et en protéines de la solution A sont respectivement de 8.10^{-8} mol/L et de 20 mg/L.
La solution **B** est obtenue en dissolvant le substrat **S** à une concentration de 9.10^{-4} mol/L.

La constante catalytique k_2 ou k_{cat} de **E** pour **S** dans le milieu réactionnel est de $2{,}2.10^4$ / minute.
Après démarrage de la réaction, la cinétique de libération du produit P est la suivante :

- 2000 µmol/L après 2,5 minutes
- 4000 µmol/L après 5 minutes
- 5800 µmol/L après 7,5 minutes
- 7100 µmol/L après 10 minutes

Q1. Calculez la vitesse initiale dans le milieu réactionnel

Q2. Quelle serait la Vmax dans le milieu réactionnel si la concentration en substrat dans ce même milieu était saturante ?

Q3. En supposant que dans le milieu réactionnel les conditions conventionnelles choisies pour déterminer la concentration catalytique de **E** soient des conditions saturantes en substrat, calculez la concentration catalytique et l'activité spécifique de **E** dans la solution **A**.

Q4. Calculez le K_M du couple enzyme-substrat.

Q5. Sachant que la masse molaire de E est de 44000, en déduire le poids d'enzyme correspondant à 1 U en conditions conventionnelles de Vmax.
Quel serait le poids d'enzyme contenant 1 U pour des conditions conventionnelles différentes avec une concentration en substrat dans la solution B égale à 2 K_M ? Commentez.

Exercice 32

On mesure la concentration catalytique d'une enzyme dans un milieu réactionnel obtenu par mélange d'une solution d'enzyme **(solution A)** et d'un tampon contenant le substrat spécifique de cette enzyme (**solution B)**. Le K_M du couple enzyme substrat est de $2{,}5.10^{-4}$ mol/L et la constante catalytique k_{cat} est de $3{,}5.10^3$ min^{-1}.
La vitesse initiale mesurée dans le milieu réactionnel pour une concentration en substrat égale à 6 K_M est de 120.10^{-6} mol/L/min.

Q1. Quelle serait la Vmax dans le milieu réactionnel si la concentration en substrat était saturante pour l'enzyme ?

La concentration catalytique de l'enzyme dans la solution A est de 280 U/L lorsqu'elle est mesurée dans des conditions conventionnelles de saturation de l'enzyme par le substrat.

Q2. Quelle est la concentration molaire en enzyme dans la solution A ?

Q3. Quelle est la concentration molaire en substrat de la solution B de départ (correspondant à une vitesse initiale de 120.10^{-6} mol/L/min).

La solution A est obtenue en dissolvant 10 mg de poudre de protéine enzymatique pure dans 100 mL d'une solution appropriée.

Q4. Quelle est l'activité spécifique de la solution A en conditions conventionnelles de Vmax ?

Q5. Quelle est la masse molaire de l'enzyme utilisée dans cette étude ?

Exercice 33 ***

On mesure la concentration catalytique d'une enzyme dans un milieu réactionnel obtenu par mélange de 0,2 mL d'une solution d'enzyme **(solution A)** et de 1,8 mL d'une solution d'un substrat S1 spécifique de cette enzyme (**solution B1)**.
La **solution A** est réalisée par mise en solution de 10 mg de poudre d'enzyme dans 1 mL de tampon approprié. La concentration catalytique de la poudre (mesurée en conditions conventionnelles de Vmax) est de 3,3 U/mg de poudre.
La **solution B1** contient le substrat S1 à une concentration de 2.10^{-3} mol/L. La constante catalytique k_{cat} de l'enzyme pour S1 est de $5{,}2.10^{4}$ min^{-1}.
La cinétique d'apparition du produit P dans le milieu réactionnel est la suivante:

- 1500 µmol/L après 30 secondes
- 3000 µmol/L après 1 minute
- 4500 µmol/L après 90 secondes
- 5200 µmol/L après 2 minutes

Q1. Quelle est la vitesse initiale dans le milieu réactionnel ?

Q2. Quelle serait la Vmax théorique de ce milieu réactionnel ?

Q3. Quel est le K_M du couple enzyme-substrat S1 ?

On refait la même expérience que celle initialement décrite mais avec une solution B2 de contenant un substrat S2 également spécifique de l'enzyme mais structuralement différent et à une concentration de $1.\ 10^{-3}$ mol/L. Le K_M de l'enzyme pour S2 est identique à celui pour S1. La vitesse initiale mesurée dans ces conditions dans le milieu réactionnel est de 5500 µmol/L/min.

Q4. Calculez la constante catalytique de l'enzyme pour le substrat S1.

Q5. Calculez le temps de rotation du substrat S1 sur l'enzyme.

Exercice 34 ***
La mesure de la concentration catalytique d'une enzyme E est réalisée dans un milieu réactionnel obtenu par mélange de 0,5 mL d'une solution A de l'enzyme E et 0,5 ml d'une solution B contenant 8.10^{-4} mol/L d'un substrat spécifique de cette enzyme.
La solution A est à 5.10^{-9} mol/L en enzyme, à 1,50 g/L en protéines et sa concentration catalytique en enzyme E déterminée en conditions conventionnelles de Vmax est de 300 U/L.
On connaît par ailleurs la valeur de la constante de vitesse de 1er ordre : $k_{-1} = 5.10^{4}$ / min.

La cinétique d'apparition du produit P dans le milieu réactionnel est la suivante:

- 60 µmol/L après 30 secondes
- 120 µmol/L après 1 minute
- 180 µmol/L après 90 secondes
- 220 µmol/L après 2 minutes

Q1. Calculez la vitesse initiale et la Vmax théorique dans le milieu réactionnel

Q2. Calculez le K_M du couple enzyme-substrat

Q3. Calculez la constante catalytique de l'enzyme et l'activité spécifique de l'enzyme dans la solution A.

Q4. Calculez la valeur de la constante de vitesse k_1.

Exercice 35

On désire étudier une préparation **A** de lactate déshydrogénase (LDH) en utilisant la réaction catalysée à partir du pyruvate et du NADH. Pour cela, on ajoute (temps t = 0 de la réaction) dans une cuve réactionnelle (thermostatée à 25 °C et de 1 cm de trajet optique) **50 «L** de cette préparation à **0,95 mL** d'un mélange réactionnel de pyruvate et de NADH solubilisés dans le tampon de la réaction (phosphate de sodium 0,05 M pH 7,0). Après agitation, la variation d'absorbance est lue à 340 nm dans un spectrophotomètre dont le zéro a été préalablement réglé sur le tampon phosphate. On obtient les résultats suivants :

Temps (en sec)	**$A_{340\ nm}$**
20	1,336
30	1,236
40	1,136
50	1,036
60	0,941
70	0,849
80	0,761

NB :

- le coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm est de 6,3 x 10^3 $cm^{-1}.mole^{-1}.L$
- les concentrations en pyruvate et NADH dans le mélange réactionnel sont respectivement de 0,70 mM et 0,24 mM.

Q1. Rappelez le principe de la méthode pour mesurer la concentration catalytique (dénommée aussi « activité enzymatique ») de la LDH.

Q2. Calculez l'absorbance théorique à 340 nm dans la cuve immédiatement après ajout des 50 µL de préparation enzymatique **A.** Commentez cette valeur par rapport à celle lue à 20 secondes.

Q3. Calculez la vitesse initiale dans la cuve et en déduire la concentration catalytique de LDH dans la préparation A.

Q4. Calculez les concentrations en substrats et produits dans la cuve réactionnelle après 80 secondes de réaction. En déduire le ΔG de la réaction et si le système est proche de l'équilibre.
On donne : $\Delta G°'$ = - 26055 $J.mol^{-1}$, R = 8,315 $J.mol^{-1}.K^{-1}$

Q5. Calculez la constante d'équilibre K'eq ainsi que les concentrations en substrats et produits de la réaction à l'équilibre. Quelle serait l'absorbance à l'équilibre ?

Exercice 36

On désire comparer les paramètres enzymatiques d'une phosphatase alcaline (PAL) et d'une phosphatase acide (PAC) partiellement purifiées. La pureté est analysée par électrophorèse en gel d'agarose, comme pour un protéinogramme classique, en déposant 5 µL d'une solution de chacune des préparations purifiées à 30 g/L en protéines totales. Selon les résultats la PAL est jugée pure à 50 % et la PAC à 80 %.

Q1. Détaillez la démarche expérimentale qui a permis d'obtenir ces pourcentages. Précisez notamment la technique classique qui devrait permettre de localiser et caractériser les enzymes sur leurs tracés respectifs.
Précisez la classe de ces deux enzymes et leur numéros dans la nomenclature internationale (EC number).

Q2. On souhaite maintenant déterminer les constantes cinétiques, K_M et k_{cat}, de chaque enzyme dans le cadre de l'hydrolyse d'un substrat synthétique le paranitrophénylphosphate (PNPP).
On précise que la concentration en protéines totales dans le milieu réactionnel est de 10 mg/L et que les masses moléculaires de la PAL et de la PAC sont respectivement de 50 kDa et 16 kDa. Les K_M et Vmax mesurées dans le milieu réactionnel sont reportées dans le tableau ci-dessous.

	K_M en mM	Vmax en $\mu M.min^{-1}$
PAL	0,078	2,76
PAC	0,049	4,55

Décrivez votre démarche expérimentale (citez notamment les paramètres essentiels qui doivent être définis et celui qui est la variable). Quel est le signal que vous aller mesurer et comment aller vous le transformer en vitesse de réaction ? Quel type de représentation

graphique allez-vous choisir et comment à partir de cette représentation graphique allez-vous mesurer K_M, Vmax?

Q3. A partir des données ci-dessus calculez la constante catalytique des 2 enzymes.

Q4. Pour mesurer les concentrations catalytiques des deux préparations dans le milieu réactionnel on choisit comme condition conventionnelle une concentration en PNPP de 0,312 mM pour la PAL et de 0,147 mM pour la PAC.

- calculer la vitesse initiale de la réaction pour chacune des préparations
- en déduire l'activité spécifique des deux préparations enzymatique
- sachant que la vitesse initiale est mesurée par la concentration en PNP libéré après 2 min d'incubation, que la réaction enzymatique est stoppée par alcalinisation du milieu réactionnel à pH > 10 par une solution de soude 0,2 M (1v/2v de milieu réactionnel) et que dans ces conditions le PNP absorbe à 405 nm (coefficient d'extinction molaire = 19950 $mol^{-1}.cm^{-1}.L$), calculez la variation d'absorbance théorique après 2 minute d'incubation dans le milieu réactionnel alcalinisé pour chaque préparation enzymatique.

Exercice 37 (examen blanc 2009) ***

La succinate déshydrogenase (SDH) est purifiée à partir d'un extrait cellulaire. Après centrifugation et éclatement des mitochondries on obtient un extrait brut A de 75 mL dont la concentration catalytique (mesurée en conditions conventionnelles de vitesse maximale) est de 24 U/mL et dont la concentration en protéines totales est de 80 g/L. Après la dernière étape de purification, on obtient une solution B de 120 mL, de concentration catalytique 6 U/mL et de concentration en protéines totales 0,4 g/L.

Q1. Calculez les quantités catalytiques au début et à la fin de la purification, le rendement de la purification, les activités spécifiques des solutions A et B et le degré de purification dans la solution B.

L'analyse de la SDH dans la solution B en électrophorèse (PAGE en conditions non dénaturantes) révèle la présence d'une seule bande de masse moléculaire relative (Mr) à 150 kDa. On veut étudier les propriétés catalytiques de la SDH sur une solution de 1 mL de B diluée au $1/10^{ème}$ dans un tampon de même composition que celui des conditions conventionnelles à l'exception de la concentration en succinate qui est variable (la concentration en FAD est saturante). Les vitesses initiales v_o mesurées pour des concentrations en succinate dans le milieu réactionnel de 2,5 et 20 µM, sont respectivement de 0,40 et 0,565 mmol/L/min.

Q2. Représentez ces résultats en représentation d'Eadie- Hofstee. En déduire le Km de la SDH pour le succinate et la Vmax dans les conditions de l'expérience.

Q3. Tracez dans le même type de représentation graphique et sur le graphique ci-dessus, le tracé probable que l'on obtiendrait en présence d'un inhibiteur compétitif : le malonate

introduit à une concentration (I) = 4 Ki (les autres conditions expérimentales étant conservées).

Q4. A partir des résultats expérimentaux ci-dessus peut-on estimer la valeur de la constante catalytique de la SDH et si oui quelle est cette valeur ?

Exercice 38 ***

Une réaction enzymatique est inhibée par un composé A. La vitesse initiale est mesurée pour des concentrations croissantes en substrat S en absence et en présence d'une concentration fixée à 0,2 mM .en composé A. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

[S] µM	v_0 µM/min [A] = 0	v_0 µM/min [A] = 0,2 mM
1,25	12,2	11,1
2,5	23,8	20
5	45,5	33,3
10	83,3	50
25	166,7	71,4
50	250	83,3
100	333,3	90,9
200	400	95,2
500	454,5	98
2000	487,8	99,5
10000	497,5	99,9

Q1. A partir des valeurs de ce tableau extrapolez les valeurs approximatives de la Vmax et du K_M en absence et en présence du composé A.

Q2. En déduire le type d'inhibition par le composé A.

Q3.En absence d'inhibiteur, citez la (les) concentration(s) en substrat du tableau correspondant à une vitesse initiale proche de l'ordre 1 et de l'ordre 0 par rapport à S. Justifiez vos réponses.

Q4. Calculez la constante de dissociation de l'enzyme pour le composé A

Q5. Définissez le degré d'inhibition et démontrez la relation exprimant ce degré d'inhibition en fonction des concentrations en substrat et en inhibiteur et de leur constante de dissociation

Q6. Les résultats précédents sont obtenus pour une concentration en enzyme de 5 mg/L. Sachant que la masse molaire de l'enzyme est de 70000 g, calculez la constante catalytique de l'enzyme en absence d'inhibiteur.

Exercice 39 (septembre 2007) ***

On souhaite doser un substrat par voie enzymatique en mode cinétique (mesure de la vitesse initiale).

Q1 : Quel doit être l'ordre de la réaction par rapport à [S]. En déduire sur la courbe de Michaelis le domaine de la courbe concerné par cette application.

Q2 : Sachant que le Km de l'enzyme pour S est de $0{,}5.10^{-3}$ M, quelle sera dans la cuve réactionnelle la concentration maximale de S dosable par cette technique (on considère So négligeable par rapport au Km lorsqu'il est ≤ 10 % de sa valeur).

Q3 : Quelle sera l'expression de la disparition de S en fonction du temps ?

Q4 :
En pratique vo n'est pas mesurable à t = 0. On mesure plutôt S_1 et S_2 à deux temps t_1 et t_2 (méthode en temps fixé) et on calcule - Δ(S). Donner une expression de Δ(S) en fonction de So. Sachant que (S) = D0/el, donner une expression de $(S)_0$ en fonction de la variation d'absorbance.

Q5 : Sachant que pour un étalon à $0{,}25.10^{-4}$ M dans la cuve réactionnelle la variation d'absorbance est de 0,075 et que pour l'échantillon à doser préalablement dilué au $1/75^{ème}$ elle est de 0,025, calculez la concentration en mM dans l'échantillon.