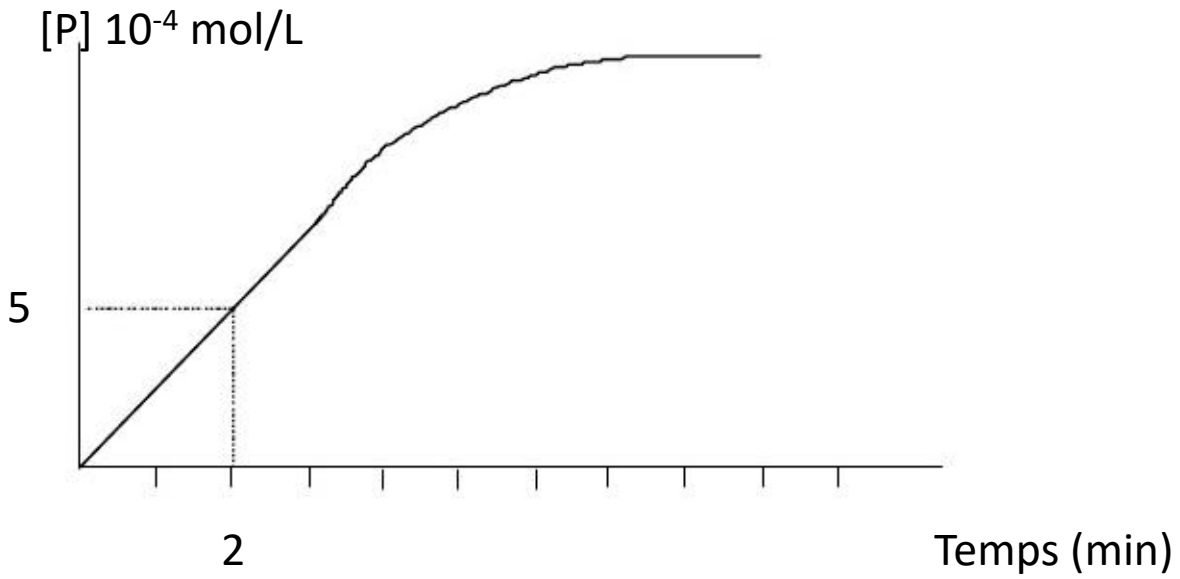
Exercice 1

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 Km et le temps d'incubation est fixé à 2 min. On donne Km de l'enzyme pour le substrat = 10^{-3} mol.L^{-1} et Kcat ou k + 2 = $4{,}4.10^{5}$ min^{-1}



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 ; (So) = cste et d'autre part pour des concentrations en substrat [So] = Km, 5 Km, 100 Km ; (Et) = cste.

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.

1.a La partie linéaire pendant laquelle la vitesse est approximée par une vitesse du type Vo = k.[ES], se confond avec la tangente et reste linéaire, soit au moins 3 minutes.

b AE = Vo = d[P]/dt (limitée aux 3 premières minutes) = 500/2 = 250 µmol/L/min

c solution B 1g/l de poudre A

Réaction : PE 0,01 ml → dilution 1/1000

S QSP 10 ml

Vitesse dans la solution B : vitesse dans la cuve x 1/dilution de PE

Vo_B = 1000 x 250 = 250 000 µmol/L/min

CC_B = 250 000 U/L soit 250 000 U/g de 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 ?

3 Les conditions conventionnelles sont modifiées (S = Km 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

2.a solution C 10 g/L de poudre A → AE cuve x 10 = 2 500 000 µmol/L/min

b anciennes conditions [S] = 10 Km → 10/11 Vmax CC_B =250 000 U/L
nouvelles conditions [S] = 1 Km → 1/2 Vmax

Nouvelle CC_B = (½*250 000)/ (10/11) = 137 500 U/L
Idem pour C CC_C = 1 375 000 U/L
Idem pour A CC_A = 137 500 *U/g*
(rq : 1 même poids d'enzyme donne des Conc. Catal. différentes selon les conditions opératoires)

3. $[E]_B$ = ?
$Vmax_B = Kcat\ [E]_B$ → $11/10*250\ 000\ 10^{-6} = 4{,}4\ 10^5\ [E]_B$
$[E]_B = 62{,}5\ 10^{-8}$ M

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

4 a Quantité catalytique spécifique = $AS_B = CC_B/[prot]_B$ = 250 000/0,25
= 1 000 000 U/g de protéine

b MM = 200 kDa (ou 200 000 g/mole)
$[E]_B$ =62,5 10^{-8} M ce qui représente = 0,125 g/L

Or [prot]B = 0,25 g/l soit 50% impureté dans B
Pdre A : 1 g de A contient 0,25 g/L de PT (dont 0,125 g/L d'impuretés protéiques) et forcément 0,75 g/L d'excipient donc 12,5 % d'impureté protéique

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 NADH2 et pyruvate dans le milieu réactionnel (après addition du sérum) au départ de la réaction (t = 0).

Pyruvate + $NADH,H^+$ → lactate + NAD

pyr (0.63 mM):	3000 µL	dil 3000/3150
NADH (11.3 mM):	50 µL	dil 50/3150
vol PE :	100 µL	dil 100/3150
vol total ou mel react:	3150 µL	

1. $[NADH]_{MR}$ = 11.3 x 50/3150 =179,4 µM
2. $[pyruvate]_{MR}$ = 0.63 x 300/3150 = 600 µM

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,H^+ à 340 nm = 6,3.10+3.mol^{-1}.cm^{-1}.L

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

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

2. On considère que seul le NADH absorbe à 340 nm:

A = ε lc $A_{NADH\ to}$ = 179,4.10-6 x 6300 x 1 = 1,13 (pas d'unité)

3. Décroissance régulière de l'absorbance de 0,2 pendant les trois première minutes. Pendant ce temps la cinétique de disparition du substrat en fonction du temps est linéaire et correspond à la tangente quant t→0 de [S] = f(t). Les conditions de vitesse initiale sont vérifiées pendant les 3 premières minutes.

4. PENDANT LES TROIS PREMIERES MINUTES UNIQUEMENT Vo = - d[NADH]/dt

Vo_{cuve} = Δ[NADH]/Δt considérant beer lambert Δ[NADH] = ΔA/εl

Vo_{cuve} = ΔA/Δt x 1/εl = 0,2/1 x 1/(6300x1) = 3,17 10^{-5} mol/L/min

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

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

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

5.

$Vo_{cuve} = \Delta A/\Delta t \times 1/\varepsilon l \rightarrow Vo_{échantillon} = \Delta A/\Delta t \times 1/\varepsilon l \times Vol_{tot}/Vol_{echantillon}$

$F = 1/\varepsilon l \times vol_{tot}/vol_{echant}$

F est un facteur constant si l'on ne change pas les conditions opératoires qui permet de calculer les activités obtenues dans l'échantillon pour n'importe quel échantillon à condition d'être toujours en conditions de vitesse initiale. Pour un résultat exprimé en U/L, ε doit être exprimé en µmol/L/cm. $F = 1/ (6.3\ 10^{-3} \times 1) \times 3150/100 = 5000$ (µmol/L)

6.

$CC_{sérum} = \Delta A/\Delta t \times F = 0.2/1 \times 5000 = 1000$ U/L

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 ?

1. Le principe du dosage d'un substrat par une enzyme en mode cinétique (cinétique en temps fixée) est que la vitesse initiale doit être proportionnelle à la concentration en substrat au départ, donc une réaction d'ordre 1 par rapport à [S]

2. [S]< 0.1Km [S] < 10^{-5} M on ne pourra pas doser de substrat au-delà d'une concentration de 10^{-5} mol/L sinon S ne devient plus négligeable devant Km et la vitesse initiale ne sera plus proportionnelle à [S]

4-En pratique Vo n'est pas mesurable à t = 0. On mesure plutôt S1 et S2 à deux temps t1 et t2 (méthode en temps fixé) et on calcule Δ(S). Démontrer la relation exprimant $(S)_0$ en fonction de Δ(S). Sachant que (S) = DO/εl, donner l'expression de $(S)_0$ en fonction de la variation d'absorbance.

$$v_0 = -\frac{d(S)}{dt} = \frac{k_{cat}(E)_t}{K_M}(S) = \frac{V_{max}}{K_M}(S) = K(S) \qquad \frac{d(S)}{(S)} = -K\ dt$$

En pratique la mesure de la vraie vitesse initiale est ici très délicate (voire impossible) car la variation du signal et le temps pendant lequel cette variation évolue linéairement sont très faibles (conditions de Vo très courte quand [S] est très petit) or il faut un certain temps pour mélanger les réactifs…

Pour contourner cette difficulté la variation de signal est lue entre deux points sur la partie non linéaire de la cinétique (cinétique en temps préfixés)

En intégrant la dernière équation : $Ln(S) = -Kt + \lambda$ à t = 0 $Ln(S)_0 = \lambda \Rightarrow (S) = (S)_0 e^{-K.t}$

La consommation de S suit une cinétique régie par une fonction exponentielle. Pour calculer $[S]_0$, il suffit de connaître $[S]_1$ et $[S]_2$ mesurés à deux temps t_1 et t_2

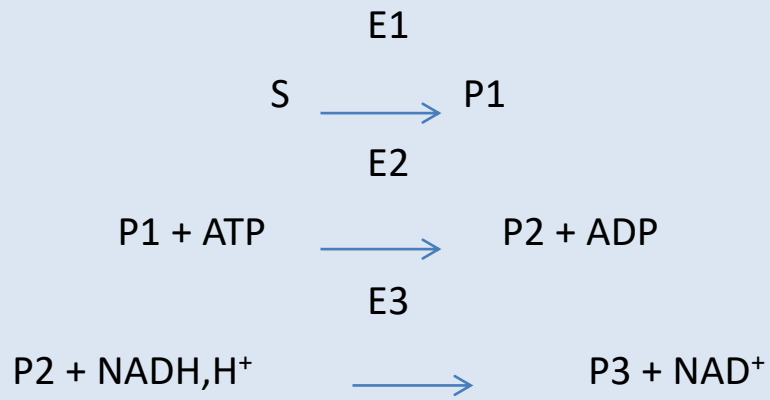
$$(S)_1 = (S)_0 e^{-K.t_1} \qquad (S)_2 = (S)_0 e^{-K.t_2} \rightarrow \Delta(S) = (S)_2 - (S)_1 = (S)_0\left[e^{-K.t_2} - e^{-K.t_1}\right]$$

$$(S)_0 = \frac{\Delta(S)}{\left[e^{-K.t_2} - e^{-K.t_1}\right]} \qquad \boxed{(S)_0 = \frac{\Delta A}{\varepsilon.l\left[e^{-K.t_2} - e^{-K.t_1}\right]} = K_1.\Delta A}$$

avec $K_1 = \frac{1}{\varepsilon.l\left[e^{-K.t_2} - e^{-K.t_1}\right]}$ et $K = \frac{V_{max}}{K_M}$

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).

1. Pour réaliser le dosage d'un substrat par une enzyme par une méthode en cinétique on doit avoir (S) ≤ 0,1 Km alors Vo = K [S] c'est une réaction d'ordre 1 par rapport à S
2. la réaction principale catalysée par E1 doit être la réaction limitante, donc les concentrations en S, P1, P2 sont limitantes. Par ailleurs, la vitesse de la réaction indicatrice E3 doit être supérieure à celle de la réaction auxiliaire E2 (elle même supérieure à la réaction limitante E1). Donc (E3) > (E2) > (E1) et les concentrations en ATP et NADH doivent être en excès par rapport à leur Km respectif

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 A pour S et l'étalon sont respectivement de - 0,015 et - 0,020, calculer la concentration plasmatique de S.

3. [S] max cuve = 60 x (15/750) = 1,2 mM → [S] max cuve ≤ 0 0,1 Km d'où un Km ≥ 12 mM. La valeur minimale du Km doit être de 12 mM.

4. $(S)_x / (S)_{et} = (\Delta A)_x / (\Delta A)_{et} = - 0,015 / - 0,020 \Rightarrow (S)_x = 3,75$ mM

Exercice 7

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

$$\text{Asparte} + \alpha\text{-cétoglutarate} \xrightarrow{E1} \text{oxaloacétate} + \text{glutamate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH,H+} \xrightarrow{E2} \text{malate} + \text{NAD+}$$

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 ?

1. E2 = enzyme indicatrice. Sa concentration doit être très supérieure à E1 de façon que la vitesse de la réaction indicatrice ne soit pas limitante par rapport à E1.

2. (- le pyridoxal phosphate est le coenzyme. Il est ajouté en excès pour qu'il ne soit pas limitant pour les éventuels sérum déplétés (e.g. hémodialysés…).

- la LDH permet de tenir compte de façon stœchiométrique de la décarboxylation spontanée de l'oxaloacétate en pyruvate. Ce dernier est ensuite transformé en lactate avec une consommation équivalante de NADH.

3-Le Km de l'ASAT pour l' α-cétoglutarate est égal à 4 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 ε = 6,3 10^{3} $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

3. [α-cétoglutarate] $_{cuve}$ = 144 x (20/240) = 12 mM soit 300 Km. E1 est saturée, la vitesse est égale à la Vmax. V0/Vmax = (S)/[Km + (S)] = 300/301 # 1

4. AE $_{échantillon}$ = $\Delta A/\Delta t$ x $1/\varepsilon l$ x Vol $_{tot}$/Vol $_{echantillon}$ = (0,08/6300) x10^{6} x 12 = 152 U/L

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.

1. Rendement = (quantité catalytique finale/quantité catalytique initiale) x100 (%)

Act. Specifique = conc. catalytique / conc. en protéines totales (U/g)

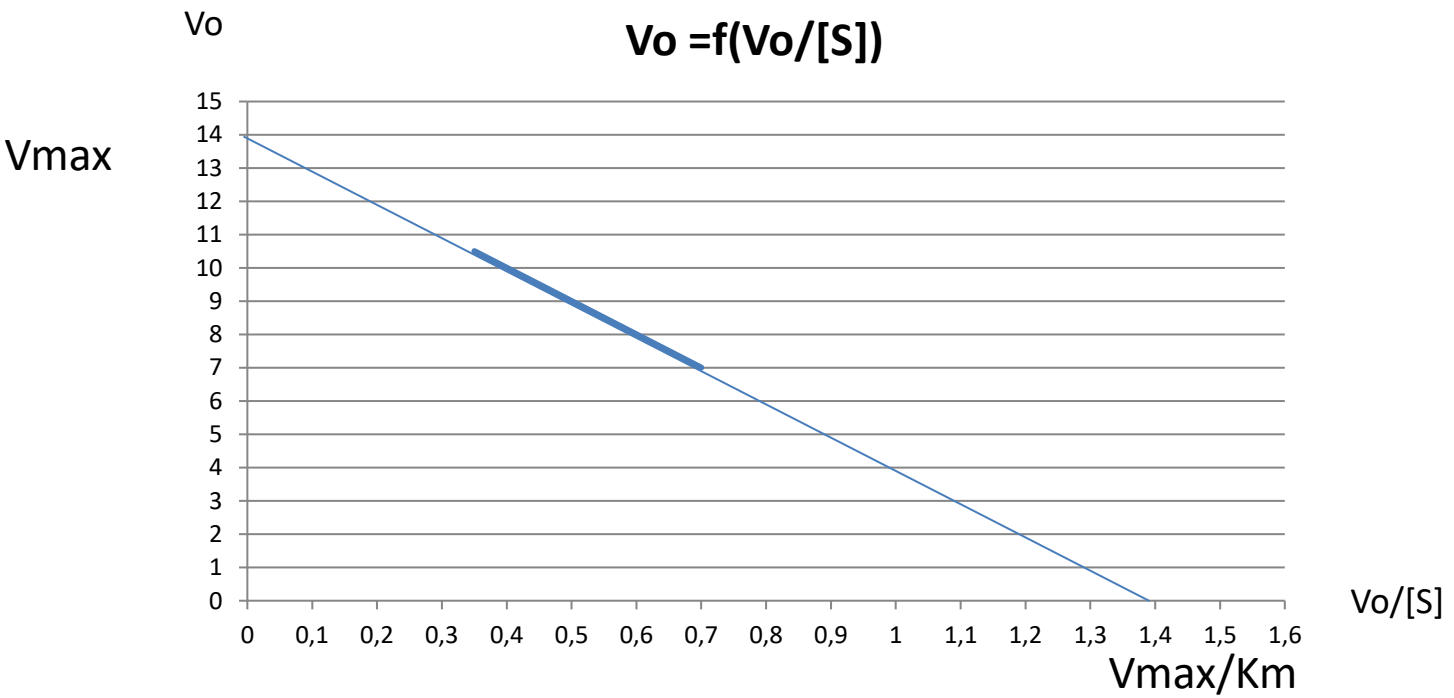
Degré de purification = AS finale/AS initiale (sans unité)

	volumes (mL)	Conc Cat (U/L)	Qtté Catal U	Conc prot (g/L)	Act Speci (U/g)	rendement (%)	degres pur
broyat	400	4	1,6	80	0,05	-	-
etape x	10	120	1,2	6	20	75	400

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 1/10ème 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 Vo mesurées pour des concentrations en glucose dans le milieu réactionnel de 10 et 30 mM, sont respectivement de 7 et 10,5 µmol/L/min.

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

[S]	Vo	Vo/[S]
10	7	0,7
30	10,5	0,35



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 1/50ème ; 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.

2. Eadie-Hofstee : Vo = f (Vo/S). Intersection avec l'axe des y donne Vmax ; intersection avec x donne Vmax/Km ; pente = (-) Km. On en déduit Vmax = 14 µmol/L/min et Km = 10 mM.

3. Tracé probable : droite parallèle puisque Km inchangé, mais avec des valeurs d'intersection avec les axes y et x 5 fois plus faibles.

4.On tient compte de la dilution au 1/10: Vmax solution B = 14 µmol/L/min x 10 = 140 µmol/L/min or Vo solution B = 120 µmol/L/min en conditions conventionnelles

Vo / Vmax = a /(a + 1) = 6/7. On en déduit a = 6, et donc (S) = 6 Km = 60 mM soit 60.10^{-3} M.

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 ?

5. Le PAGE-SDS démontre que la GK est apparemment pure avec une MM à 35 kDa donc $[E]_{tot} = [\text{protéine}]_{totale}$

On calcule Kcat à partir de la relation Kcat = Vmax/(Et) avec Vmax = 140.10^{-6} mole/L/min et $[E]_{tot} = 6/ 35000 = 171{,}4\ 10^{-6}$ mole/L. Donc Kcat = 0,817 min^{-1}.

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 Vo 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.

1. Linweaver Burck :

$1/Vo = 1/Vm + Km/Vm \times 1/[S]$

y = 1/Vo en $\mu mol^{-1}.L.min$ et x = 1/[S] en L/mmol ; pente = Km/Vm et intersection abscisses : -1/Km, intersection ordonnées : 1/Vm

$1/Vm = 4.10^4$ $Vm = 25.10^{-6}$ µmol/L/min

$-1/Km = 4.10^4/1,6$ $Km = 4.10^{-5}$ mM

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 + 4,0.104

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

2.

$1/Vm_{app} = 4.10^{4}$ $Vm_{app} = 25.10^{-6}$ µmol/L/min = Vmax

$-1/Km_{app} = 4.10^{4}/2,8$ $Km_{app} = 7.10^{-5}$ mM > Km

Un inhibiteur qui n'affecte pas la Vitesse maximale et augmente le Km (diminue l'affinité de l'enzyme pour son substrat) est un inhibiteur compétitif.

$Km_{app} = Km \times (1 + [I]/Ki)$

$7,10^{-5}/4.10^{-5} = 1 + 22,5/Ki$ → Ki = 30 µM

la constante de dissociation du malonate pour la SDH est de 30 µM.

3-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 (I50) pour un degré d'inhibition de 0,5 (soit 50 %). Calculer cette concentration pour (S) = Km

3. Degré d'inhibition : $\frac{Vo-Vi}{Vo} = \frac{\frac{Vm[S]}{Km+[S]} - \frac{Vm[S]}{Km(1+\frac{I}{Ki})+[S]}}{\frac{Vm[S]}{Km+[S]}}$

on multiplie tout par 1/Vm[S] puis par Km + [S] (élimine le dénominateur de la grande fraction) puis met au même dénominateur ce qui reste au numérateur enfin on divise tout par Km pour obtenir

$\frac{Vo-Vi}{Vo} = \frac{I/Ki}{1+\frac{I}{Ki}+\frac{S}{Km}}$ on multiplie tout par Ki

$\frac{Vo-Vi}{Vo} = \frac{I}{Ki+I+Ki\frac{S}{Km}}$ d'où $\frac{Vo-Vi}{Vo} = \frac{I}{I+Ki(1+\frac{S}{Km})}$

IC 50% : degré d'inhibition = ½ donc $I_{50\%}$ = Ki x (1+ [S]/Km)
Si [S] = Km alors $I_{50\%}$ = 2Ki = 60 µM

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 Molaire = 6,3 10^3 mol/L/min) absorbe à cette longueur d'onde.

1. dosage en mode cinétique et en conditions conventionnelles d'une concentration catalytique ou d'une concentration d'enzyme. Les conditions conventionnelles sont telles que Vo = K.(Et)

Signification du premier chiffre de la nomenclature enzymatique : classe des oxydo-réductases

2. absorbance après R1 = $0{,}2.10^{-3}$ x (250/260) x $6{,}3.10^3$ = 1,2115

A après R2 = 1,21 x (260/310) = 1,0161 ou 0,2 x (250/310) x 6,3 = 1,0161

3-L'analyseur calcule la concentration catalytique (U/L) dans le plasma par la formule (ΔA/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 ?

3. CC en U/L = - (ΔA/min) x F avec F = (10^6/6300) x (310/10) = 4921

4. CC du patient = (0,122/2) x 4921 = 300 U/L
   CC en nkat/L = 300 x (109/60.10^6) = 5000 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.

1 – Quelle est la teneur en impuretés non protéiques de la poudre ?

2 – 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)

1. 30 mg de protéine pour 100 mg de poudre soit 70% d'impureté non protéique

2. Rendement = (quantité catalytique finale/quantité catalytique initiale) x100 (%)

Activité Spécifique = conc. catalytique / conc. en protéines totales (U/g)

Degré de purification = $AS_{finale}/AS_{initiale}$

a- 30 %

b- AS (A) = 1,6 U/mg et AS(B) = 800 U/mg

c- 500

Exercice 22

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

-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
V0 µM/min	3	6	9

- 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 Km et la Vmax de l'enzyme.

1. tous les paramètres physico-chimiques de la réaction à l'exception de la variable (S) : tampon (nature, molarité, pH), autres sels (force ionique), T, autres effecteurs de la réaction (autres substrats, coenzymes, activateurs, métaux…), définir les conditions de vitesse initiale pour la concentration en substrat choisie la plus faible, définir le Δt pour mesurer Vo…

2. on applique l'équation de Michaèlis pour 2 couples de valeurs Vo et (S). On obtient ainsi un système de 2 équations à 2 inconnues que l'on résout.
En désignant Vmax par y et Km par x on obtient pour les 2 premiers couples :
$3 / y = 2 / (x + 2)$ et $6 / y = 5 / (x + 5)$.

En divisant ces 2 équations membre à membre ⇒ $3/6 = 2(x + 5) / 5(x + 2)$

⇒ $0{,}5\ x = 5$ ⇒ $x = Km = 10$ mM

On reporte ensuite x dans un des couples de valeurs : par exemple en prenant le couple du milieu on obtient : $6 / y = 5 / (10 + 5)$ ⇒ $y = Vmax = 18$ µmol/L/min

NB : on constate dans le tableau que la concentration la plus élevée correspond (comme par hasard) à (S) = 10 mM = Km. La vitesse initiale correspondante (= 9 µmol/L/min) doit théoriquement correspondre à Vmax/2 et donc Vmax = 18 µmol/L/min

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
V0 µmol/L/min	2,57	4,5	6

3.

- Calculez le Km 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

3. - En procédant comme dans R2 on obtient Km = 5 mM et Vmax = 9 µmol/L/min. Km et Vmax sont tous deux diminués d'un même facteur 2.

On en déduit que le composé C se comporte comme un inhibiteur incompétitif.

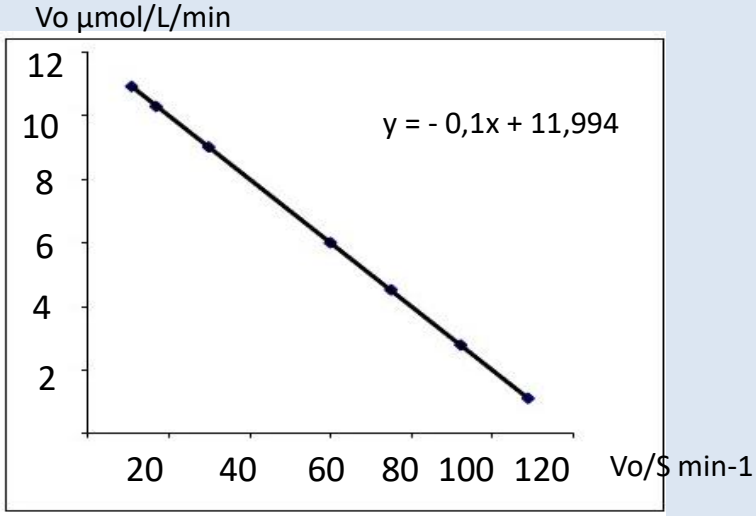
$Vmax_{app} = Vmax / [1 + (I)/Ki] \Rightarrow [1 + (I)/Ki] = 2 \Rightarrow Ki = (I) = 0,1$ mM

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.

1. 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 :



1. Vo = 9 µmol/L/min

2. 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 Km et Vmax.

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

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

4. Calculez la Vmax et le Km de cette solution B. Tracer sur le graphique ci-dessus la droite correspondant à cette solution.

2. Eadie – Hofstee $Vo = Vmax – Km (Vo/[S])$
D'après l'équation de la droite : Vmax # 12 µmol/L/min et Km selon la pente = 0,1 unités de (S) soit 0,1 mM Ou bien passer par l'expression de l'intersection avec l'axe des abscisses : $Vmax/Km \# 120 \Rightarrow Km = 12/120 = 0,1$ mM.

3. (S) en conditions conventionnelles correspond à Vo = 9 µmol/L/min. En écrivant (S) = a.Km on obtient : $Vo/Vmax = a/(a + 1) = 9/12 \Rightarrow a = 3 \Rightarrow (S) = 3$ KM = 0,3 mM

4. La concentration en enzyme est 3 fois plus faible donc Vmax = 12/3 = 4 µmol/L/min et Km demeure inchangé. La droite correspondante est parallèle à la première. Elle coupe l'axe des ordonnées à 4 µmol/L/min et l'axe des abscisses à 40 min^{-1}

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 la solution de substrat S1 elle-même à la concentration de 2.10^{-3} mol/L. La constante catalytique Kcat 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

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

1. la partie linéaire de [P] = f(t) pendant laquelle la vitesse est approximée par une vitesse du type Vo = k.[ES], est d'environ 1,5 minutes.

Vo = d[P]/dt pendant les 1,5 premieres minutes

Vo = 3000/1 = 3000 µmol/L/min

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

3. Quel est le Km du couple enzyme-substrat S1 ?

Les protéines totales sont dosées dans la poudre d'enzyme. Le résultat obtenu est de 500 mg de protéines par g de poudre.

4. Quelle est l'activité spécifique de l'enzyme dans la poudre ?

On refait la même expérience que celle initialement décrite mais avec une solution A contenant 5 mg de poudre dans 1 mL de tampon.

5. Quelle sera la vitesse initiale mesurée dans ces conditions dans le milieu réactionnel ?

2. A est à 10 g/L de pdre à 3,3 U/mg donc CCA = 33 000 U/L (en conditon de Vmax) donc correspondant à une Vmax dans A de 33000 µmol/L/min.
Vmax dans le milieu réactionnel compte tenu de la dilution au 1/10ème = 3300 µmol/L/min.

3. Définissons la concentration en substrat dans le milieu réactionnel par (S1) = a Km.
Vo/Vm = a/(a+1) soit 3000/3300 = 0,908 = a/(a+1) La résolution de l'équation de MM donne a = 10. donc (S1) = 10 Km = 2.10^{-3} x 9/10 = $1,8.10^{-3}$ mol/L d'ou Km = $0,18.10^{-3}$ mol/L

4. 1 mg de poudre contient 0,5 mg de protéines et donc pour une CC de poudre à 3,3 U/mg AS = 6,6 U/mg de protéines

5. On divise par deux la concentration en enzyme donc Vo = 1500 µmol/L/min

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 Km 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.

6. Calculez la constante catalytique de l'enzyme pour le substrat S2.

7. Calculez le temps de rotation des substrats S1 et S2 sur l'enzyme.

6. Km identique ($0{,}18.10^{-3}$ M) donc [S2] cuve = [S2] x 9/10 = $0{,}9.10^{-3}$ = 5Km
Vo2 = 5500 = Vmax [S]/(Km+ S) V02 = 5/6 Vmax2 → Vmax2 = 6600 µmol/L/min = 2x Vmax 1
Or Vmax = Kcat.[E]tot donc Kcat2 = 2 x Kcat1 = $10{,}4.10^{4}$ min^{-1}

7. Temps de rotation = 1/Kcat
Pour S1 TR1= 1/ $5{,}2.10^{4}$ = $1{,}92.10^{-5}$ min
pour S2 TR2 = 1/$10{,}4.10^{4}$ = $9{,}610^{-6}$ min

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	Vo µM/min [A] = 0	Vo µM/min [A] = 0,2 mM
1,25	12,2	11,1
2,5	23,8	20
5	44,5	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

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

1. En absence de A la vitesse tend vers un maximum de 500 µmol/L/min = Vmax et pour Vmax/2 (250) on trouve une concentration en substrat de 50 µM = Km

De la même façon, en présence de A : Vm app = 100 µmol/L/min et Km app = 10 µM

2. En déduire le type d'inhibition par le compose A.

3. 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.

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

5. 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

2, A est un inhibiteur qui diminue Km et Vm d'un même facteur donc A se comporte comme un inhibiteur incompétitif.

3. ordre 1 : Vo = [Vmax/Km].(S) cela suppose [S] < 0,1 Km soit < 5 µM.
   ordre 0 : Vo = Vmax cela suppose [S] > 10 Km soit > 500 µM.

4. Kd = Ki. Par exemple pour les Km: Km app= Km/[1 + (I)/Ki)]. Soit 1 + (I)/Ki) = 5 et donc Ki = (I)/4 = 50 µM

5. degré d'inhibition = (Vo – Vi)/Vo on remplace … $\frac{Vo-Vi}{Vo} = \frac{I}{I+Ki(1+\frac{Km}{S})}$

6. 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.

6. $K_{cat} = V_{max}/(E_t) = 500.10^{-6} \times 70000/5.10^{-3} = 7000\ min^{-1}$