

UE 91 - PHBMR 2024

Mardi 2 avril & vendredi 5 avril

ENZYMOLOGIE

RAPPELS

&

Correction exercices 4-9-13-16

+

Correction 3 annales & exercices 7-14-18

arnaud.bruneel@aphp.fr

arnaud.bruneel@universite-paris-saclay.fr

Conditions de vitesse initiale



- Excès de Substrat par rapport à l'enzyme
- Début de la réaction

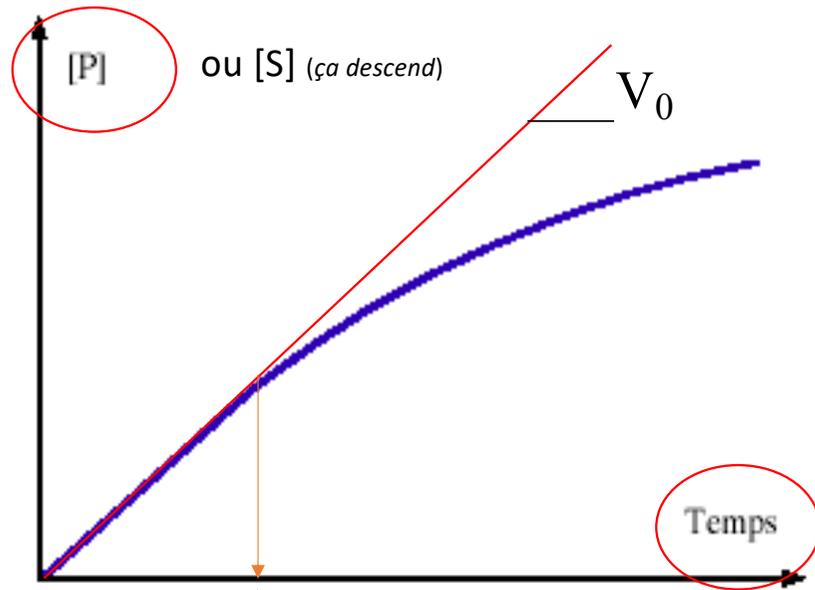
- En conditions de vitesse initiale (**vous pouvez la mesurer**), la réaction enzymatique « va » dans un seul sens.

- Si la réaction « part » dans l'autre sens, vous n'êtes plus en conditions de vitesse initiale, **et ne pouvez donc pas la mesurer**.



NE PAS CONFONDRE !!!

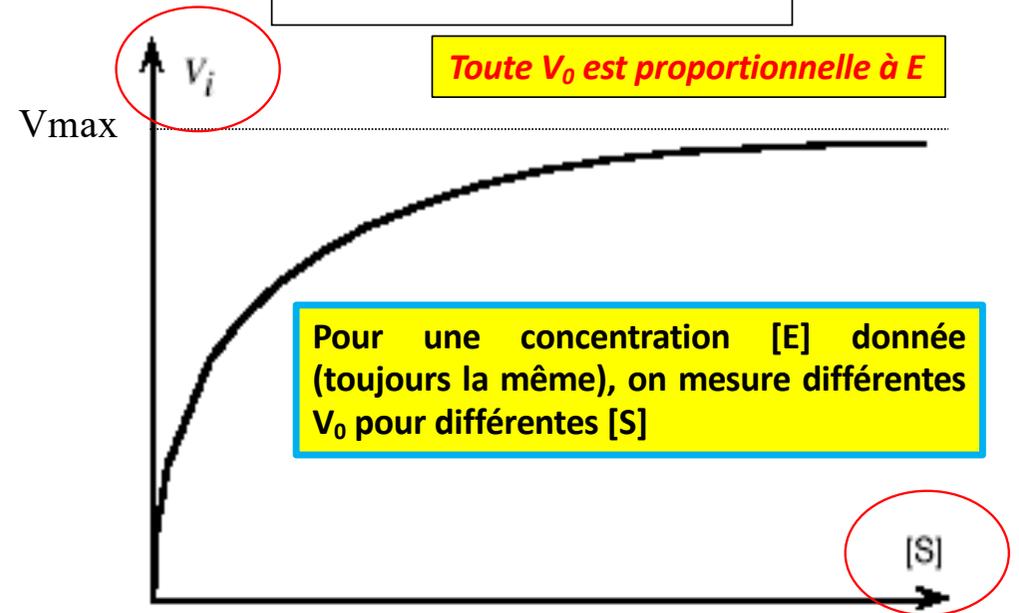
Concentration en enzyme (concentration catalytique, activité catalytique ; unités ?) à déterminer à partir d'une vitesse initiale V_0
On donne [S] à une solution d'enzyme, on mesure V_0 , on en déduit CC



→ V_0 et Δt (temps phase stationnaire)

- $V_0 = k_{+2} [ES] = k_{cat} [ES]$
- $V_{max} = k_{cat} [E]_{tot}$

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



→ V_{max} et K_m

- **V_{max}** est la **vitesse initiale** pour une concentration théorique infinie **en substrat** c.à.d. lorsque toute l'enzyme du milieu réactionnel est sous forme ES. L'enzyme est « au max » (« saturée »)...

- **K_m** est la **concentration en substrat** pour laquelle la moitié de l'enzyme est sous forme complexée ES → $V_0 = \text{moitié de } V_{\text{max}}$.

K_m est une **constante spécifique du couple enzyme-substrat**. **Reflet** de l'affinité du substrat pour l'enzyme. K_m est une constante (dans des conditions expérimentales données). Quand **Enzyme + Substrat + « autre chose »** : « **K_m apparent** » ou « **mesuré** »

- **K_{cat}** (K_{+2}) est la **constante catalytique**. Elle est spécifique **de l'enzyme et du substrat** et représente (à saturation) le **nombre de molécule de substrat consommées par molécule d'enzyme et par seconde** (unité de temps). Unité de $K_{\text{cat}} = \text{temps}^{-1}$

Elle représente le *turn-over* de l'enzyme. K_{cat} est une constante (dans des conditions exp données).

- **Efficacité catalytique** = K_{cat}/K_m

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

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

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

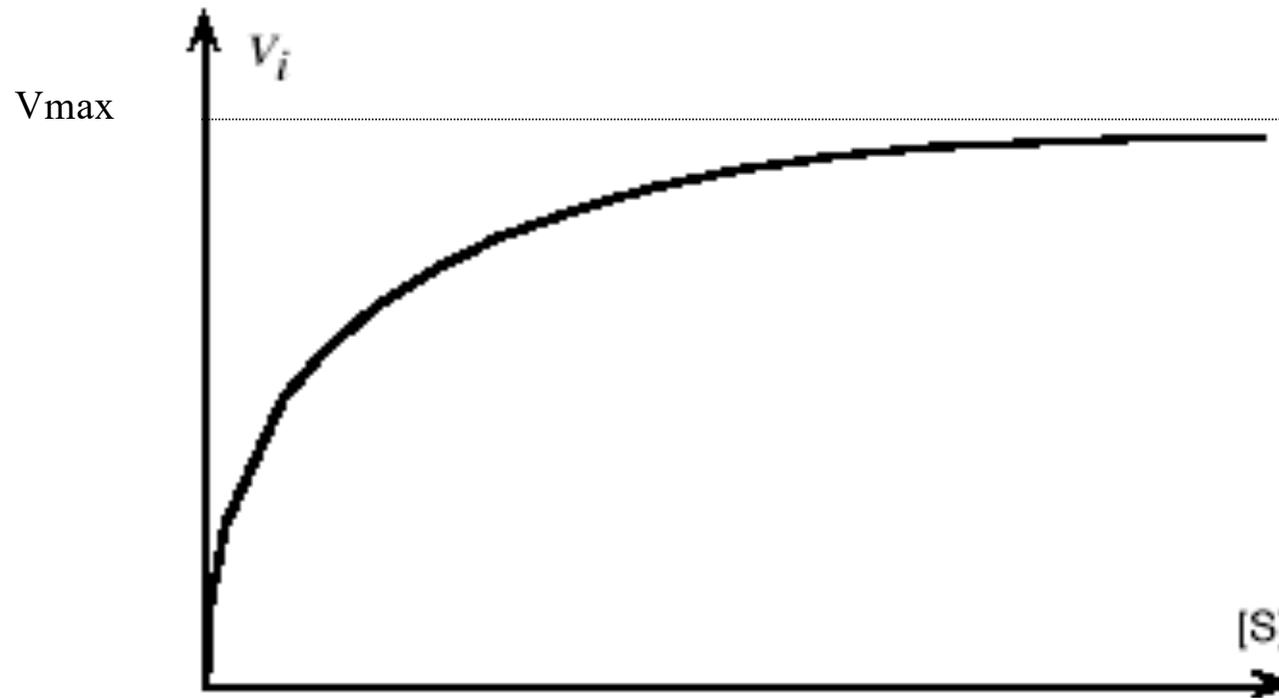
*Lorsque dans un exercice, vous avez les valeurs numériques de (S) et de Km, **exprimez** systématiquement (S) en nombre de Km...*

Vous n'avez pas le choix, c'est un ordre...

Idem pour (I) et Ki ...

Représentation de Henry Michaelis-Menten

Pour la même solution d'enzyme, on mesure V_0 pour différentes (S) et V_0 en fn S

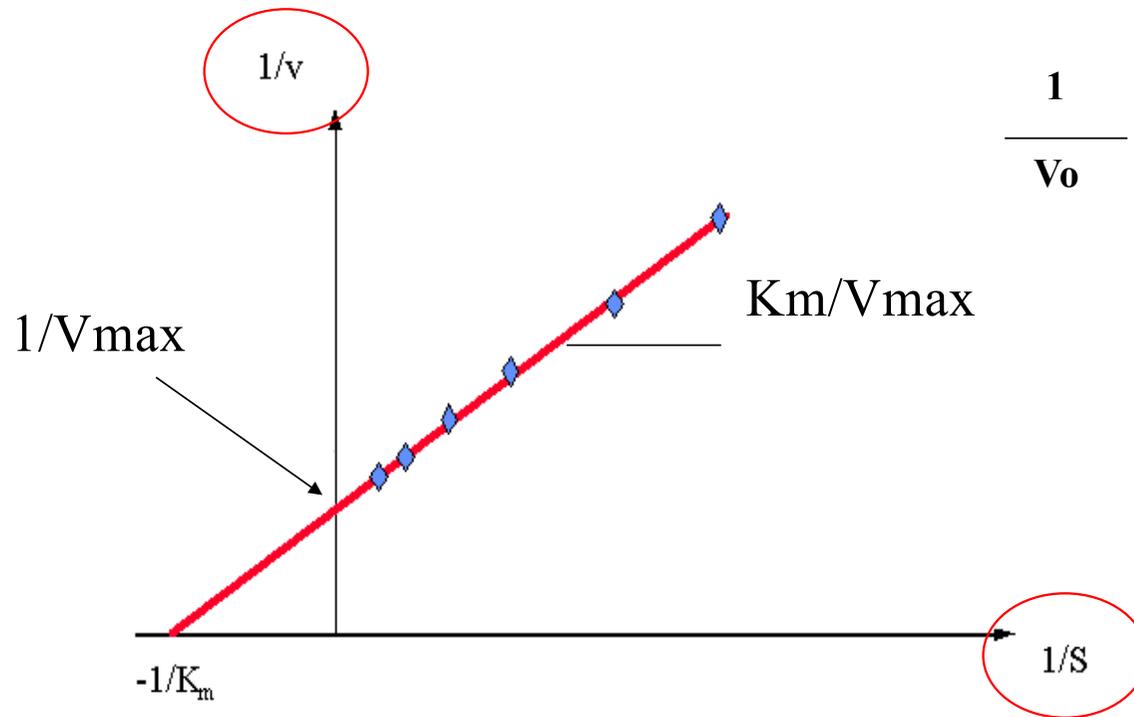


Enzyme michaelienne (l'équation de HMM est respectée)

Représentation de Lineweaver et Burk

Pour la même solution d'enzyme, on mesure V_0 pour différentes (S) et $1/V_0$ en fn $1/S$

À retrouver vous-même
C'est très simple...

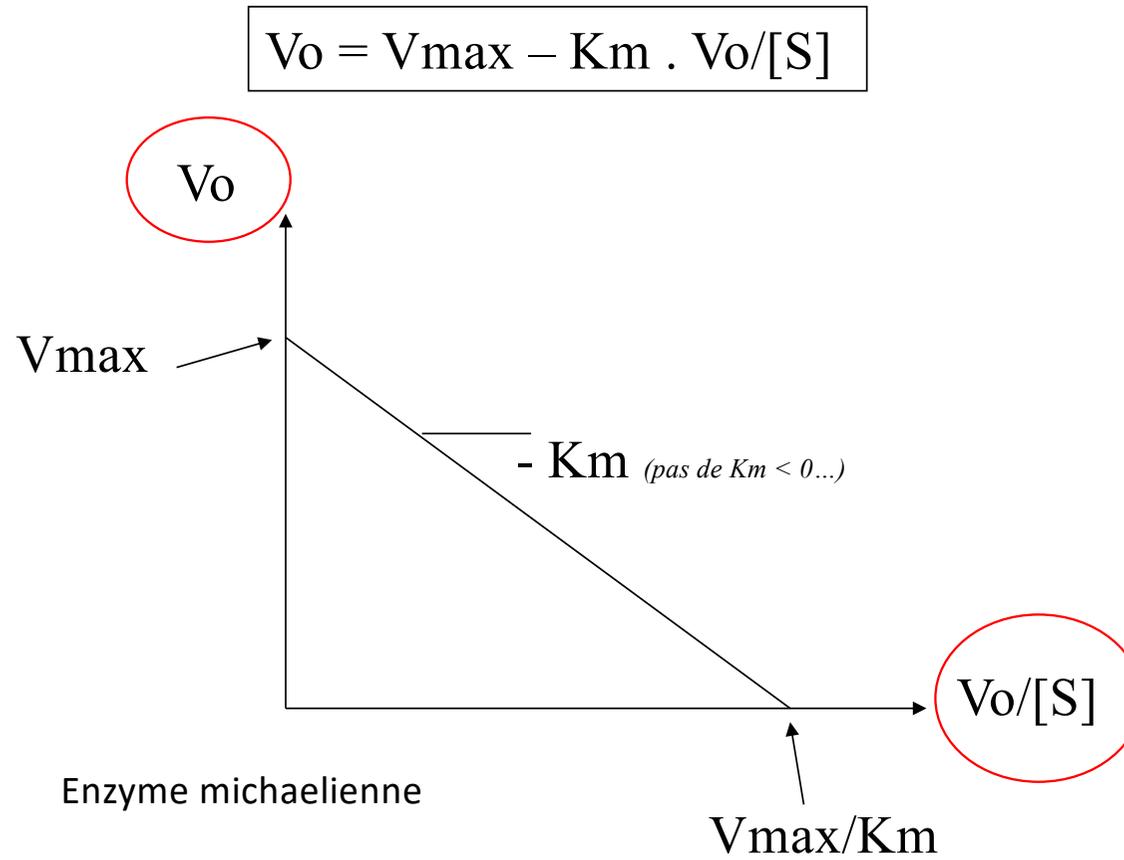


$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Enzyme michaelienne

Représentation d'Eadie-Hofstee

Pour une même solution d'enzyme, on mesure V_0 pour différentes (S) et V_0 en fn V_0/S

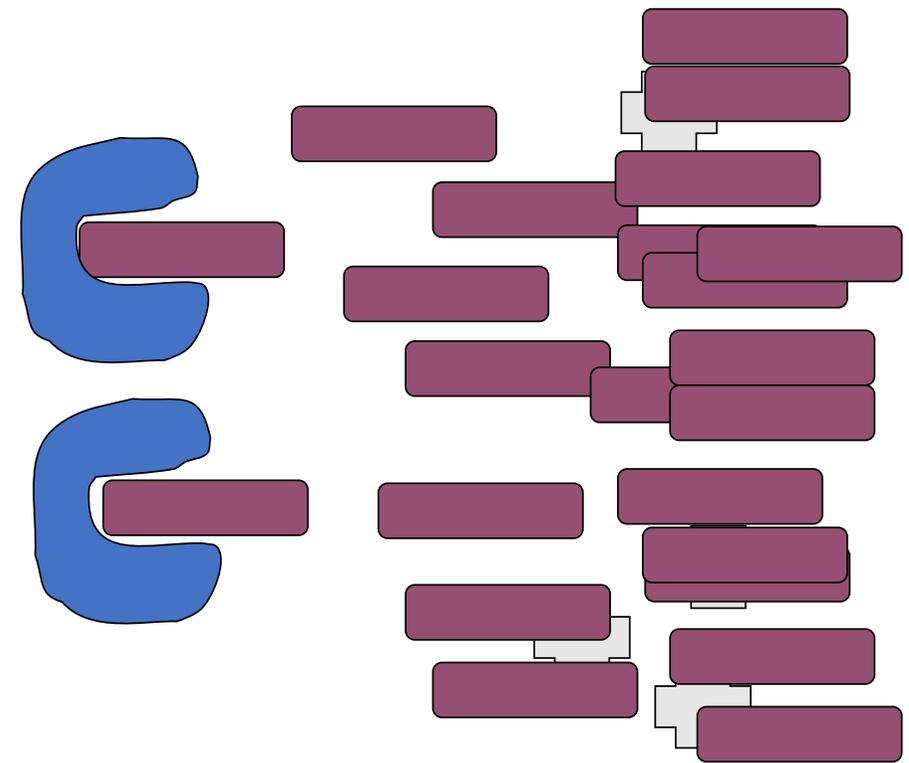
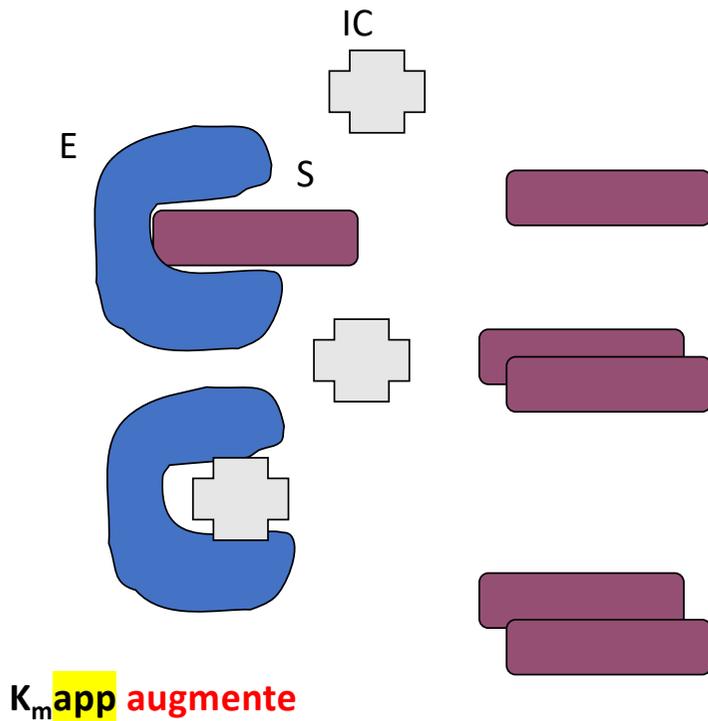


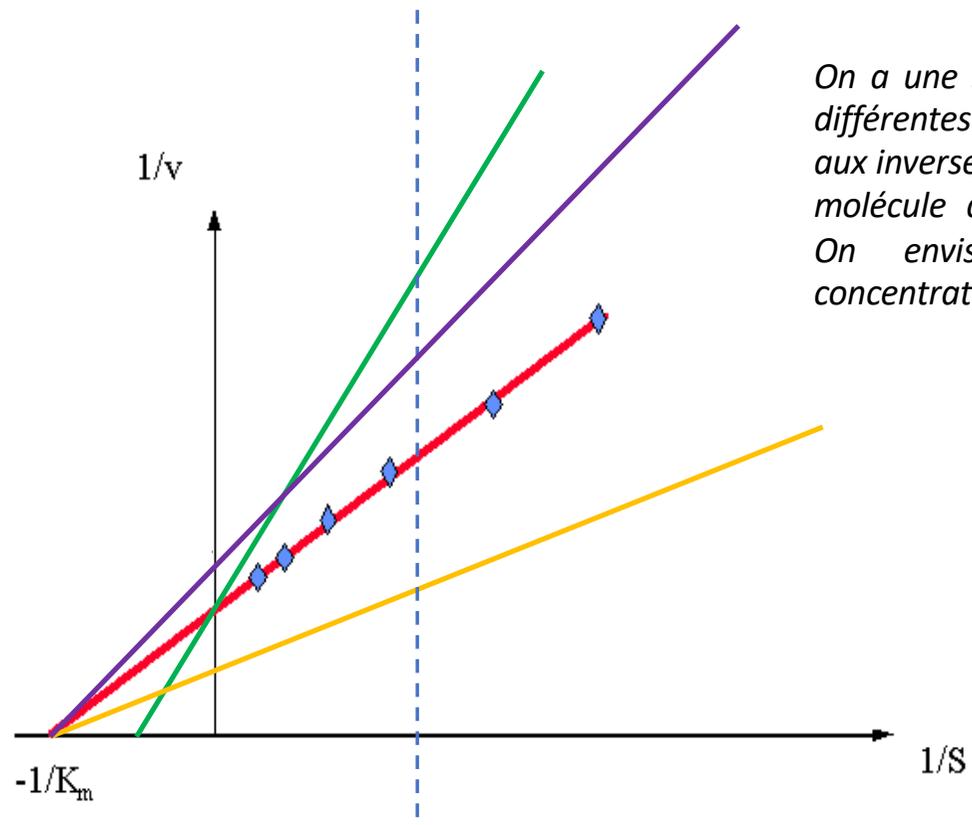
Inhibition compétitive

Représenter Inhibition non compétitive (INC)
 V_{max} apparent diminue (K_{cat} apparent)

En conditions de V_0 = excès de substrat,
l'IC **inhibe** → V_0 app ou mesurée **diminue**

En conditions de V_{max} = excès +++ de substrat,
l'IC « n'est plus là », l'IC **n'inhibe plus** → V_{max} app **identique**



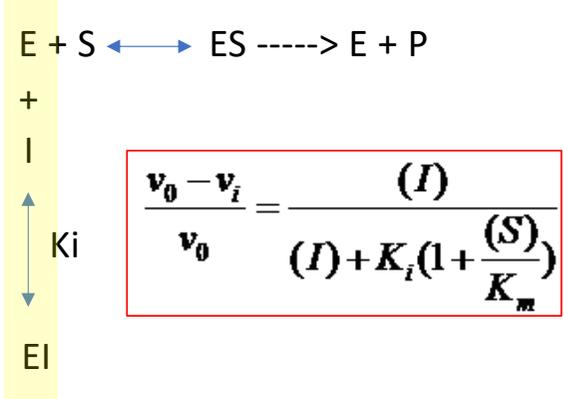


On a une solution d'enzyme [E], on lui donne différentes [S], on mesure V_0 et on « passe » aux inverses. En l'absence ou en présence d'une molécule additionnelle (inhibitrice ou autre). On envisage éventuellement différentes concentrations de la molécule.

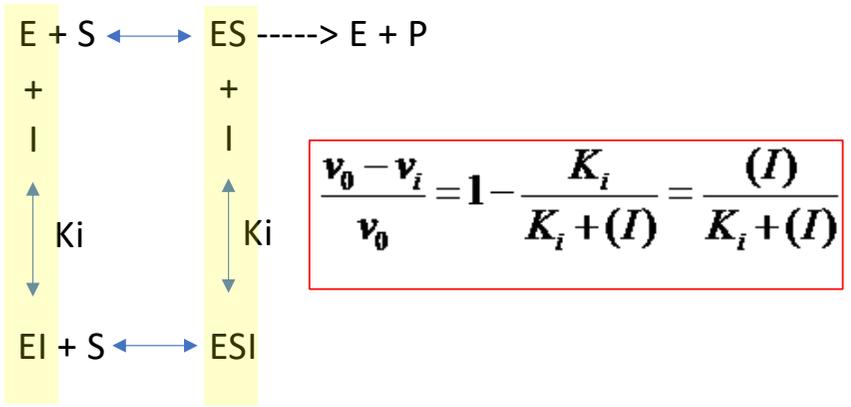
+ IIC...

$$V_{0_{app}} = \frac{V_{max_{app}} \cdot [S]}{K_{m_{app}} + [S]}$$

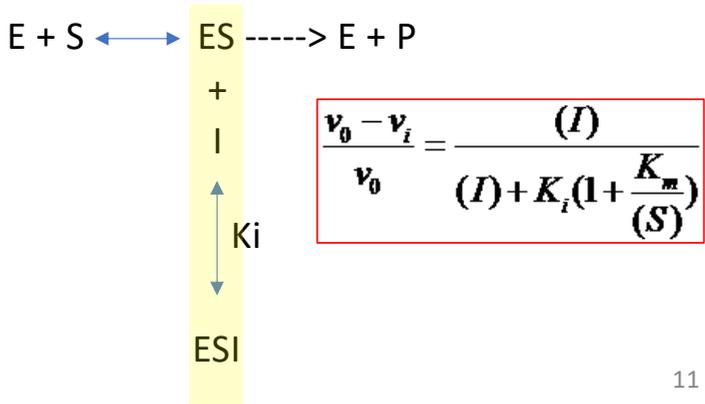
IC



INC



IIC



Pour déterminer une concentration catalytique (une activité enzymatique...), il faut mesurer une vitesse initiale V_0

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

??

Je mesure le travail fourni par une enzyme en conditions de V_0 et j'en déduis la quantité (concentration) correspondante

Définitions U et katal !!

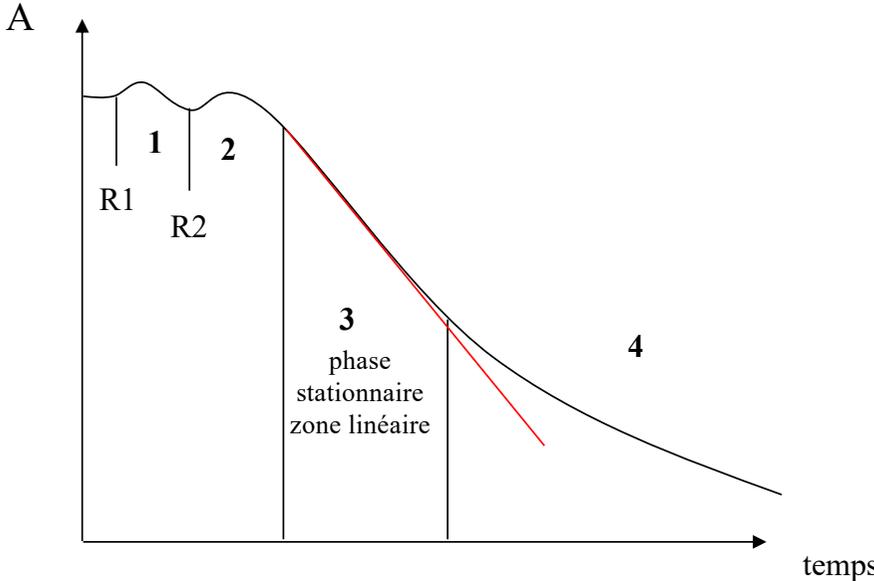
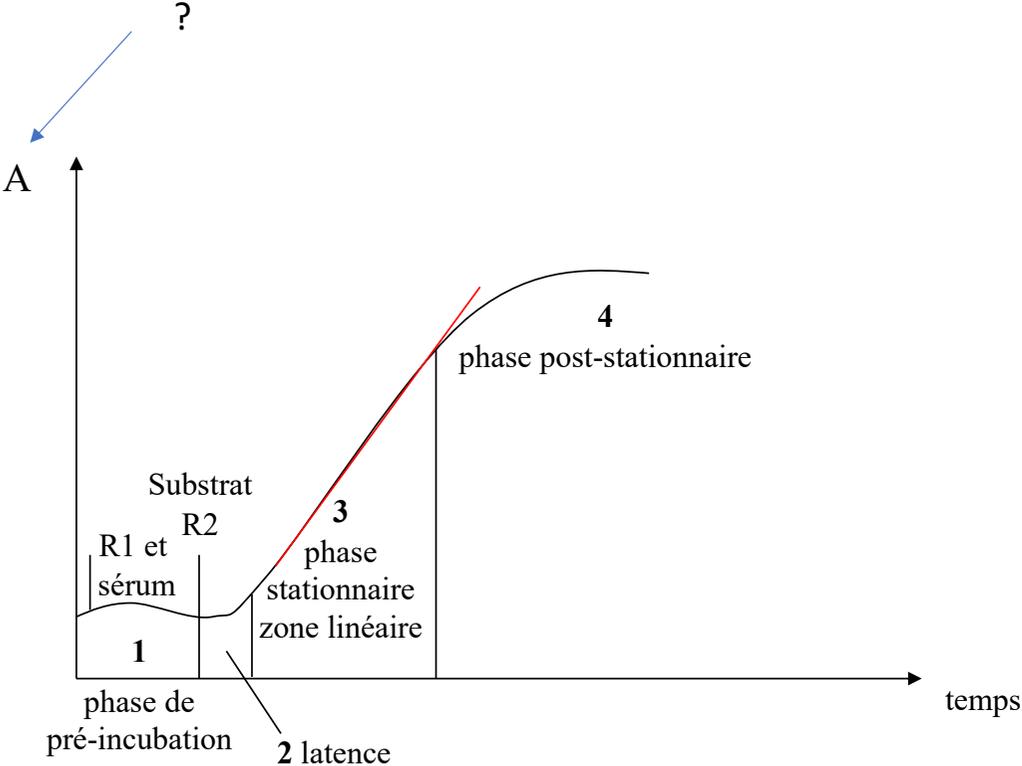
1 U = quantité d'enzyme permettant de transformer/former une µmole de substrat/produit par minute.

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

1 katal = $60 \cdot 10^6$ U

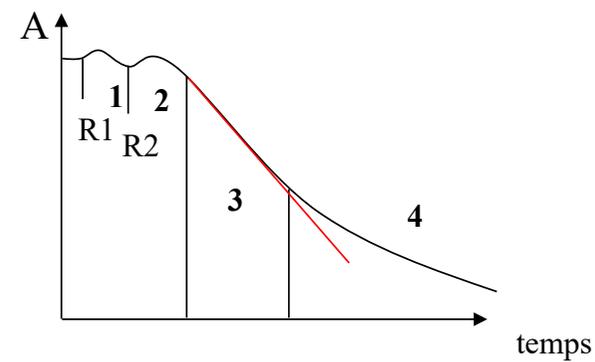
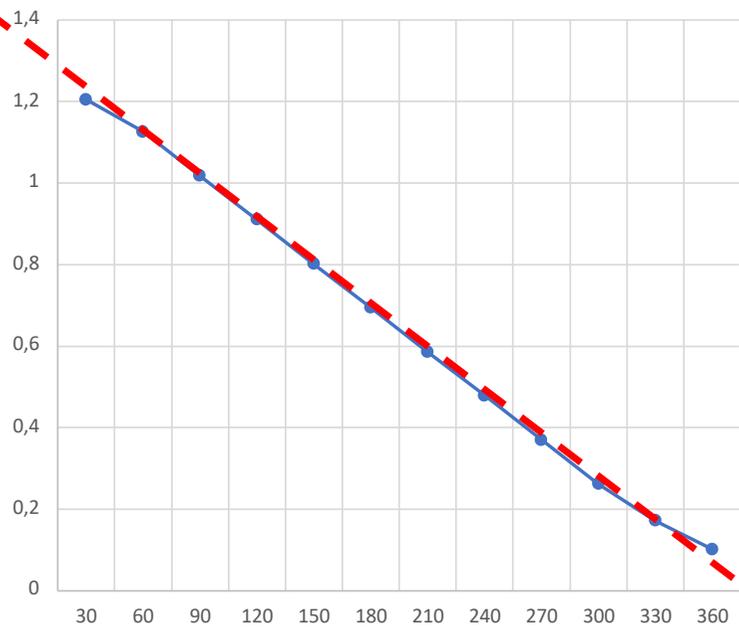
*Formellement, 1 U ou 1 kat **ne sont pas des vitesses**...
Ce sont des **quantités** d'enzyme correspondant à des vitesses...
Des fois, cela dépend des profs... il faut s'adapter...*

Dans un automate de biochimie...



Concours 2021 !!

Graphique de l'absorbance en fonction du temps (secondes)



Phase stationnaire

Phase stationnaire = zone linéaire = zone de mesure de la V_0

Dans cette zone, la vitesse de la réaction est constante (c'est une V_0) ; le calcul de la V_0 se fait donc à partir de la pente de la courbe Absorbance = f (temps) $\rightarrow \Delta A/\Delta t$

Il faut ensuite déduire $\Delta C/\Delta t$ (vitesse) à partir de $\Delta A/\Delta t$

D'après la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon LC$

$$\rightarrow C = A/\epsilon L$$

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

$$\rightarrow V_0 \text{ dans l'échantillon} = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon L \times V_t/V_e$$

Dilution dans la cuve



Avec V_t = volume total du milieu réactionnel dans la cuve

V_e = volume de la prise d'essai

ϵ = coefficient d'extinction molaire (à la longueur d'onde utilisée) du produit formé ou du substrat transformé.

Unités de $\epsilon = \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

si les unités proposées sont différentes, il faut s'adapter...

Exercices 4-9-13-16

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 $[S] = 10 K_M = 10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. L'activité enzymatique de la solution mesurée dans les conditions conventionnelles donne :

$$v_0 = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}.$$

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 $[I] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Le K_i de l'enzyme pour l'inhibiteur = $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

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.

$$\begin{aligned} - K_M &= 10^{-4} \text{ M} \\ - V_0 &= 10/11 V_{\max} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} -IC &\rightarrow V_{\max} \text{ app id} \\ K_M &\text{ app plus grand} \\ - (I) &= 4 K_M \end{aligned}$$

Exo 4



$$S = 10 K_m = 10 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \rightarrow K_m = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

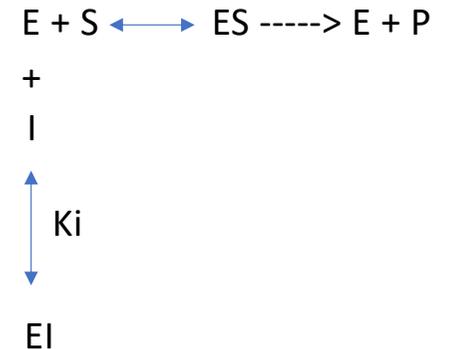
$$V_0 = V_{\max} 10/11$$

$V_0 = 5 \cdot 10^{-6}$ mol de P formé par min dans 1 litre

- 1) $V_{\max} = V_0 \times 11/10 = V_0 \times 1,1 = 5,5 \cdot 10^{-6}$ mol de P formé par min dans 1 litre
 - 2) I compétitive : $I = 2 \cdot 10^{-5}$ mole par litre ; $K_i = 0,5 \cdot 10^{-5}$ mole par litre ($I = 4 K_i$)
- IC \rightarrow K_m app augmente ; V_{\max} app identique

$$(S) = n K_m \rightarrow V_0 = V_{\max} n/n+1$$

IC



$$V_{\text{app}} = (V_{\max \text{ app}} \times S) / (K_m \text{ app} + S)$$

$$\text{Et } K_m \text{ app} = K_m (1 + I/K_i) = 5K_m = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$\rightarrow V_{\text{app}} = (5,5 \cdot 10^{-6} \times 10 \cdot 10^{-4}) / (5 \cdot 10^{-4} + 10 \cdot 10^{-4}) = 5,5 \cdot 10^{-6} \times 10/15 = 3,67 \cdot 10^{-6}$ mol de P formé par min dans 1 litre

% inh (IC) = $4K_i / (4K_i + K_i (1 + 10 K_m/K_m)) = 4 K_i / 15K_i = 4/15 = 26,67 \%$

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

IC : quand S augmente, le % inh diminue

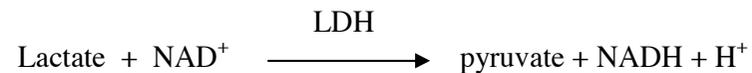
3) INC = pas d'impact

$$\frac{v_0 - v_i}{v_0} = 1 - \frac{K_i}{K_i + (I)} = \frac{(I)}{K_i + (I)}$$

IIC = quand S augmente, le % inh augmente (voir formule page 10 SVP)

Exercice 9

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



NADH, H⁺ absorbe à 340 nm



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 est de $6,3 \cdot 10^{+3} \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{+1} \text{ cm}^{-1}$, 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

Exo 9 : Dosage du lactate plasmatique : dosage d'un substrat

Longueur de la cuve ?

LIRE L'ÉNONCÉ JUSQU'AU BOUT !!!! (R1, R2, R3)

4 μL plasma + 200 μL R1 à 10 sec , + 50 μL R2 à 1min30, + 50 μL de R3 à 5 min \rightarrow Vol tot = 304 μL – **dilution = 304/4 = 76**
La réaction démarre après ajout de R3 (5 min).

Lecture à 340 nm \rightarrow on mesure le NADH, H^+ formé à partir du lactate présent dans le plasma (dilué) de départ.

1^{ère} mesure à 5 minutes : après R3 (LDH et ALAT) = début de la transformation du lactate en pyruvate

1) Dosage en point final (à 5 min, la réaction n'a pas commencée – pas de lactate transformé ; *mode cinétique, voir exo 5*) ; à 10 minutes, tout le lactate a été (**théoriquement**) transformé (*ce serait mieux de pouvoir visualiser la courbe...*)

2) Rôle de l'ALAT et du tampon carbonate ? : « tirer » la réaction principale vers la droite (glutamate en excès et pH >7) pour consommer tout le lactate à doser. **Pas d'« histoire » de vitesse initiale et compagnie...**

3) Concentration de NADH, H^+ dans le milieu réactionnel : technique en point final \rightarrow à la 2^{ème} lecture d'absorbance, **on suppose que tout le lactate a été consommé** ; et **NADH, H^+ formé = lactate au départ** (dans le milieu réactionnel).

$A = \epsilon LC$ (on envisage le NADH, H^+) $\rightarrow C = A / \epsilon L \rightarrow \Delta C = \Delta A / \epsilon L \rightarrow \Delta C = 0,378 / 6300 = 6.10^{-5}$

$\text{mol}^{-1} \text{ l}^{\text{+}} \text{ cm}^{-1}$,

Unités ? \rightarrow compte-tenu de l'unité de $\epsilon \rightarrow$ **mole par litre (M)**. Donc la réponse est 6.10^{-2} **mmol/L** (= 6.10^{-5} M)

Dans la solution de départ (plasma) : il faut multiplier par le **facteur de dilution = 76** $\rightarrow = 0,06 \times 76 = 4,56$ **mmol/L**

Exercice 13

$$V_{max} = 60000 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{L}$$

La LDH (lactate déshydrogénase) est un hétérotétramère de 140.000 Da. Lorsque la LDH est à une concentration de $1 \mu\text{M}$, la concentration catalytique mesurée dans des conditions conventionnelles de **vitesse maximale** est de $60 \cdot 10^3 \text{ U/L}$. La réaction catalysée est une réaction Bi-Bi ordonnée, le NADH étant le premier substrat.

NADH en 1^{er} => 2 substrats & sens de la Rn ?

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

$$V_{max} = K_{cat} (E)_{tot}$$

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 $3 K_m$?

$$V_0 = \frac{3}{4} V_{max}$$

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

Masse molaire ?

5-La vitesse initiale de la solution de LDH à $1 \mu\text{M}$ mesurée en présence d'une concentration saturante en NADH et d'une concentration en pyruvate de $0,8 \text{ mM}$ est de $20.000 \mu\text{M}/\text{min}$. Calculer le K_m de la LDH pour le pyruvate.

6-La concentration catalytique en LDH déterminée (en conditions conventionnelles de V_{max}) 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.

Exo 13 :

Quand LDH à la concentration de $1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mole/L}$ → CC en conditions de $V_{\text{max}} = 60 \cdot 10^3 \text{ U/L} = 60000 \text{ U/L}$

Bi-Bi-ordonnée (2 substrats l'un après l'autre), NADH = premier substrat (ensuite pyruvate ; *dans l'autre sens / voir exo précédent*)

k_{cat} de la LDH : **nbre de molécules de substrat transformées (à saturation) par 1 molécule de LDH par unité de temps.**

Pour $1 \mu\text{mole/L}$ de LDH en conditions de V_{max} (à saturation) : CC = 60000 U/L

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

→ $V_{\text{max}} = 60000 \mu\text{moles/min/L}$

Q1) $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} (E)_{\text{tot}} \rightarrow k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / (E)_{\text{tot}} = 60000 \text{ min}^{-1} = 1000 \text{ sec}^{-1}$.

Et $K_{\text{cat}} = \text{constante}$ (*sous réserve d'être tjs en conditions de V_{max}*).

Q2) 1 Katal = **quantité d'enzyme permettant de transformer/former une mole de substrat/produit par seconde.**

1 katal = $60 \cdot 10^6 \text{ U} \rightarrow 60000 \text{ U/L} = 0,001 \text{ katal/L} = 10^{-3} \text{ kat/L}$

Q3) Pyruvate + $\text{NADH, H}^+ \rightarrow \text{lactate} + \text{NAD}$

NADH, H^+ en concentration saturante → NADH, H^+ n'est pas le substrat limitant (**contrairement au pyruvate**)

Pyruvate = $3 K_m \rightarrow V_0 = \frac{3}{4} V_{\text{max}} \rightarrow \text{CC (pour } S = 3K_m) = \frac{3}{4} \text{ CC à la } V_{\text{max}} = \frac{3}{4} 60000 \text{ U/L} = 45000 \text{ U/L}$

Exo 13 (suite) :

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

Q4) CC en conditions de $V_{\text{max}} = 60 \cdot 10^3 \text{ U/L} = 60000 \text{ U/L}$ correspond à $1 \mu\text{mole/L} \rightarrow 60000 \text{ U}$ correspond à $1 \mu\text{mole}$.
1 mole de LDH pèse $140000 \text{ g} \rightarrow 1 \mu\text{mole}$ pèse $0,14 \text{ g} \rightarrow 60000 \text{ U}$ correspond à $0,14 \text{ g} \rightarrow 1 \text{ U}$ correspond à $0,14/60000 =$
 $2,33 \mu\text{g}$ de LDH

Voir début de l'énoncé

CC pour $S = 3 \text{ Km} = 45 \cdot 10^3 \text{ U/L} = 45000 \text{ U/L}$ correspond à $1 \mu\text{mole/L} \rightarrow 45000 \text{ U}$ correspond à $1 \mu\text{mole} = 0,14 \text{ g} \rightarrow 1 \text{ U}$
correspond à $0,14/45000 =$ **$3,11 \mu\text{g}$ de LDH**

5-La vitesse initiale de la solution de LDH à $1 \mu\text{M}$ mesurée en présence d'une concentration saturante en NADH et d'une concentration en pyruvate de $0,8 \text{ mM}$ est de $20.000 \mu\text{M/min}$.
Calculer le K_m de la LDH pour le pyruvate.

Q5) Pour $S = 0,8 \text{ mM} (= nK_m)$, $V_0 = 20000 \mu\text{moles}$ de S transformés par minute et par litre : correspond à $20000 \text{ U/L} =$
 $V_{\text{max}}/3$

$V_0 = V_{\text{max}} \cdot n/(n+1) \rightarrow n/(n+1) = 1/3 \rightarrow n = 0,5 \rightarrow K_m = 0,8/0,5 =$ **$1,6 \text{ mM}$**

6-La concentration catalytique en LDH déterminée (en conditions conventionnelles de V_{max}) 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 ?

Q6)

- 60000 U/L en conditions de V_{max} correspond à $1 \mu\text{mole/L} = 0,14 \text{ g/L}$

- 3000 U/L en conditions de V_{max} correspond à $(1/20) \mu\text{mole/L} = 0,14/20 =$ **$0,007 \text{ g/L} = 7 \text{ mg/L} = 0,01\%$ protéines totales**

Exercice 16

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

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

2-Calculer la concentration en éthanol (en unités K_i 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: K_m pour le méthanol = 10 mM ; K_i pour l'éthanol = 1 mM

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

Exo 16 :

LIRE L'ÉNONCÉ JUSQU'AU BOUT (Km et Ki) !!!!

Q1) 50 mL de méthanol = 50 X 0,79 = 39,5 g de méthanol = 39,5/32 = 1,234 moles de méthanol dans 65 X 0,6 = 39 litres
→ Concentration en méthanol = 1,234/39 = 31,64 mmoles/L = 31,64/10 = 3,164 Km

Q2) Éthanol = **inhibiteur compétitif** du méthanol à l'égard de l'ADH.

% inh = $I / (I + K_i(1 + S/K_m))$

avec

I = concentration en éthanol (l'inhibiteur)

S = concentration en méthanol (le substrat de l'ADH)

Km = constante de Michaelis du couple méthanol-ADH

Ki = constante de dissociation de l'inhibiteur = éthanol

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

S = 3,164 Km

Ki = 1 mM

→ % inh = **0,97** = (eth)/(eth) + 1(1+3,164) = (eth)/(eth) + 4,164 mM --> (eth) = 134,67 mM = 134,67 Ki # **0,135 M**

Q3)

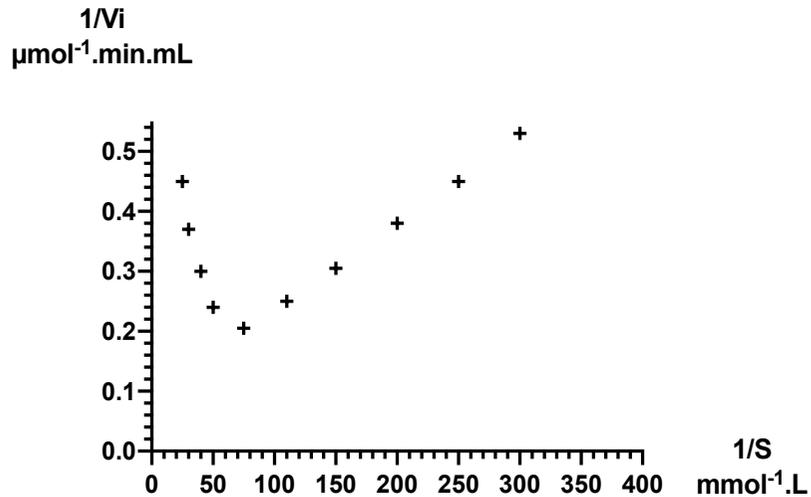
0,135 mole/L signifie :

1 litre → 0,135 moles

39 litres → 0,135 X 39 = 5,265 moles = 5,265 X 46 = 242,2 grammes d'éthanol = 242,2/0,79 # 307 mL d'éthanol (= boire 6 fois plus d'éthanol que de méthanol ingéré)

Dans les conditions dites conventionnelles, on mesure les vitesses initiales (V_i) de la réaction enzymatique catalysée par l'enzyme E pour différentes concentrations en substrat S.

On reporte les résultats obtenus dans la représentation graphique suivante :



Question 1 :

- Comment appelle t'on cette représentation graphique ?

- En vous limitant à l'aspect général de la courbe (mais sans oublier la légende des axes), tracez la représentation de Henry-Michaelis-Menten correspondante.

Question 2 :

Décrivez brièvement le phénomène observé.

Question 3 :

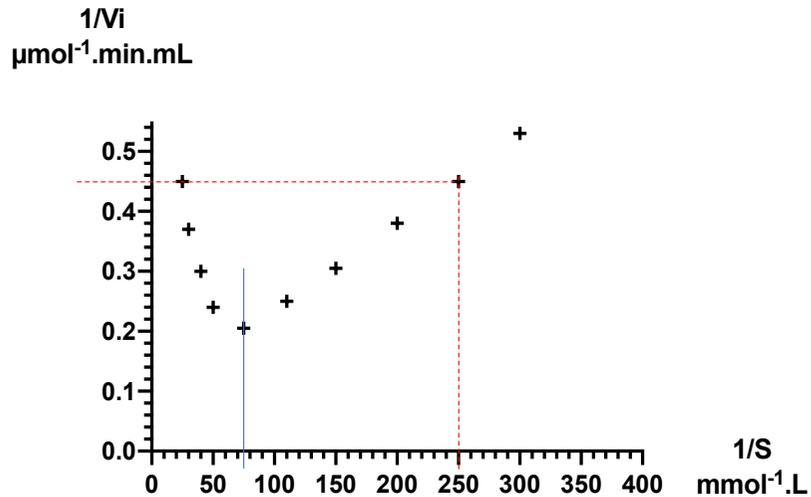
On se place à une concentration en substrat égale à 4 μmoles/L. Quelle est la vitesse initiale (V_i) correspondante ?

Question 4 :

Déterminez l'activité enzymatique correspondante en U/L et en μkatal/L

Dans les conditions dites conventionnelles, on mesure les vitesses initiales (V_i) de la réaction enzymatique catalysée par l'enzyme E pour différentes concentrations en substrat S.

On reporte les résultats obtenus dans la représentation graphique suivante :



Question 1 :

- Comment appelle t'on cette représentation graphique ? → **représentation aux double-inverses de Lineweaver et Burke**

- En vous limitant à l'aspect général de la courbe (mais sans oublier la légende des axes), tracez la représentation de Henry-Michaelis-Menten correspondante.

V_0 en fonction de S : début d'une hyperbole qui s'écroule à partir de $S = 0,0133$ mmoles/L

Question 2 :

Décrivez brièvement le phénomène observé.

Pour $S < 0,0133$ mM ($1/S > 75$ mmol⁻¹. L), V_0 augmente quand S augmente - comportement michaelien- Pour $S > 0,0133$ mM, V_0 diminue quand S augmente.

= inhibition enzymatique par excès de substrat

Question 3 :

On se place à une concentration en substrat égale à 4 μmoles/L. Quelle est la vitesse initiale (V_i) correspondante ?

$S = 4$ μM → $1/S = 250$ mmol⁻¹.L → $1/V_i$ correspondante = 0,45 μmoles⁻¹.min.mL → $V_0 = 2,222$ μmoles.min⁻¹.mL⁻¹ = 2222 μmoles.min⁻¹.L⁻¹

Question 4 :

Déterminez l'activité enzymatique correspondante en U/L et en μkatal/L = compte-tenu définitions de l'U et du μkatal, $AE = 2222$ U/L = $2222/60 = 37,03$ μkatal/L

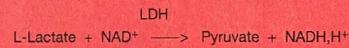
EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 3 (40 points)

Enoncé

On souhaite déterminer l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27) contenue dans une solution d'extrait de tissu musculaire partiellement purifié.

Le principe réactionnel est le suivant, à pH 9,4 (37,0 °C) :



Le mode opératoire retenu est le suivant :

- Pré-incuber 3,00 mL de réactif dans une cuve de 1 cm de trajet optique, placée dans un spectrophotomètre thermostaté à 37,0 °C
- Ajouter 150 µL de la solution d'extrait tissulaire, préalablement dilué au 1/100^{ème}
- Mélanger et lire les absorbances toutes les 30 s à 340 nm.

La variation d'absorbance maximale moyenne mesurée ($\Delta A / 30$ s) est de 0,032.

Questions**QUESTION N° 1 :**

Quels sont les composants présents dans le réactif ?
Quelles sont les conditions liées à leurs concentrations respectives ?

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde pour réaliser les mesures d'absorbance.
Préciser le sens de variation de l'absorbance à cette longueur d'onde.

QUESTION N° 3 :

Calculer la concentration en activité LDH (en U/L) contenue dans le milieu réactionnel et dans la solution d'extrait tissulaire partiellement purifié.

On donne le coefficient d'absorbance linéique molaire (ϵ) du NADH,H⁺ : 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 3 (40 points)

QUESTION N° 4 :

Pour obtenir l'extrait tissulaire partiellement purifié, on est parti de 50 mL d'une solution centrifugée d'un homogénat initial ayant une concentration catalytique en LDH de 8300 U/L et contenant 15,6 g/L de protéines.

Après purification, on obtient 15 mL d'une solution dont la concentration en protéines est de 0,85 g/L.

- a. Quel est le rendement de la purification de la LDH ?
- b. Quelle est l'activité spécifique de la solution d'homogénat initial ?
- c. Quelle est l'activité spécifique de la solution d'extrait partiellement purifié ?
- d. Quel est le degré de purification de la LDH ?

QUESTION N° 5 :

Préciser la structure macromoléculaire des isoenzymes de la LDH.
Quelle est l'isoenzyme qui prédomine dans le muscle squelettique ?
Quelle est l'isoenzyme qui prédomine dans le muscle cardiaque ?

Lactate + NAD → pyruvate + NADH,H⁺

3000 μL + 150 μL → dilution 3150/150 = 21 ; dilué au 1/100 → dilution = 2100

QUESTION N° 1 :

Quels sont les composants présents dans le réactif ?
Quelles sont les conditions liées à leurs concentrations respectives ?

Q1

On veut mesurer la « concentration en activité » LDH → il faut mesurer une V_0 → il faut être en conditions de V_0 → le réactif contient les substrats (lactate + NAD) en excès. Il faut être à un pH adéquat pour que la Rn aille vers la droite → tampon pH = 9,3 (cf cours précédent) - température 37°

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde pour réaliser les mesures d'absorbance.
Préciser le sens de variation de l'absorbance à cette longueur d'onde.

Q2

Longueur d'onde = 340 nm : l.o. d'absorption spécifique du NADH,H⁺ (NAD réduit) – voir spectre
Nous pouvons suivre l'apparition du NADH, H⁺ : variation croissante de l'absorbance

Enoncé

On souhaite déterminer l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27) contenue dans une solution d'extrait de tissu musculaire partiellement purifié.
Le principe réactionnel est le suivant, à pH 9,4 (37,0 °C) :

LDH



Le mode opératoire retenu est le suivant :

- Pré-incuber 3,00 mL de réactif dans une cuve de 1 cm de trajet optique, placée dans un spectrophotomètre thermostaté à 37,0 °C
- Ajouter 150 μL de la solution d'extrait tissulaire, préalablement dilué au 1/100^{ème}
- Mélanger et lire les absorbances toutes les 30 s à 340 nm.

La variation d'absorbance maximale moyenne mesurée ($\Delta A / 30$ s) est de 0,032.

QUESTION N° 3 :

Calculer la concentration en activité LDH (en U/L) contenue dans le milieu réactionnel et dans la solution d'extrait tissulaire partiellement purifié.

On donne le coefficient d'absorbance linéique molaire (ϵ) du NADH,H⁺ : 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Q3

Concentration catalytique de la LDH en U/L

→ Je dois déterminer la V₀ en **μmoles** de NADH,H⁺ formées par **minute** et **par litre**

$$A = \epsilon LC \rightarrow C = A/\epsilon L \rightarrow \Delta C = \Delta A \times 1/\epsilon L \rightarrow \Delta C/\Delta t = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon L = (0,032/0,5) \times 1/(6300 \times 1) \times 10^6 = 0,032 \times 10^6/3150 = \mathbf{10,16 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{L}} \text{ dans la cuve}$$

Compte-tenu de la définition de l'U → AE = 10,16 U/L dans la cuve → 10,16 X 2100 = 21336 U/L dans l'extrait (tissulaire partiellement purifié) de départ.

QUESTION N° 4 :

Pour obtenir l'extrait tissulaire partiellement purifié, on est parti de 50 mL d'une solution centrifugée d'un homogénat initial ayant une concentration catalytique en LDH de 8300 U/L et contenant 15,6 g/L de protéines.

Après purification, on obtient 15 mL d'une solution dont la concentration en protéines est de 0,85 g/L.

- Quel est le rendement de la purification de la LDH ?
- Quelle est l'activité spécifique de la solution d'homogénat initial ?
- Quelle est l'activité spécifique de la solution d'extrait partiellement purifié ?
- Quel est le degré de purification de la LDH ?

Q4

50 mL - 8300 U/L – 15,6 g/L

15 mL – 21336 U/L – 0,85 g/L

- Rendement = Qté d'enzyme finale/Qté d'enzyme initiale = $(21336 \times 15) / (8300 \times 50) = 0,7712 = 77,12 \%$
- Activité spécifique (AS) homogénat initial = Qté (Cn) d'enzyme homogénat initial/Qté (Cn) prot totale homogénat initial = $8300 / 15,6 = 532 \text{ U/g}$
- Activité spécifique (AS) extrait partiellement purifié = $21336 / 0,85 = 25101,18 \text{ U/g}$
- Degré de purification = AS finale/AS initiale = $25101,18 / 532 = 47,18$

Lors de la purification, on a perdu 23 % de l'enzyme, mais on l'a concentré 47 fois

Q5 : LDH : hétérotétramère – sous-unités H (*heart*) et sous-unités M (*muscle*)

Cœur H4 = LDH travaille dans le sens lactate → pyruvate / Muscles M4 = LDH travaille dans le sens pyruvate → lactate

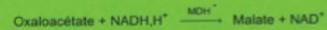
EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 5 (40 points)

Enoncé

La concentration en activité aspartate aminotransférase (ASAT = AST, EC 2.6.1.1) dans le sérum est augmentée dans un certain nombre de situations (hépatites, atteintes hépatobiliaires, infarctus du myocarde, pathologies musculaires, hémolyse, ...).

Pour sa détermination, la méthode recommandée par l'*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) à 37 °C, à pH 7,65, en présence de phosphate de pyridoxal (PP, cofacteur des aminotransférases), utilise le principe réactionnel suivant (*Clin Chem Lab Med* 2002; 40:725-733) :



* Malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37)

Un étudiant en travaux pratiques utilise cette méthode dans la cuve réactionnelle thermostatée d'un spectrophotomètre, de trajet optique de 1 cm, selon le mode opératoire suivant :

- Introduire 2,00 mL de réactif A
- Equilibrer à 37,0 °C
- Ajouter 200 µL de sérum
- Mélanger et incuber pendant 5 min
- Ajouter 200 µL de réactif B (réactif déclenchant)
- Mélanger et lire les absorbances à 340 nm toutes les 30 s pendant 6 min.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps (s)	Absorbance à 340 nm
30	1,205
60	1,126
90	1,018
120	0,911
150	0,802
180	0,694
210	0,586
240	0,479
270	0,370
300	0,262
330	0,172
360	0,102

1,205-1,126 = 0,079
Après = 0,108 en moy
Et puis 0,172-0,102 = 0,070

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 5 (40 points)

Questions

QUESTION N° 1 :

Quels sont les composants présents dans le mélange des réactifs A et B ? Préciser leur nature. Quelles sont les conditions à respecter quant à leurs concentrations ?

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde et le sens de la variation d'absorbance observée.

QUESTION N° 3 :

Sachant que le coefficient d'absorbance molaire du NADH,H⁺ à 340 nm est de 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹, calculer la concentration en activité AST dans le milieu réactionnel final et dans le sérum, en les exprimant en U/L et en µkat/L.

QUESTION N° 4 :

L'étudiant réalise, selon le même protocole, des déterminations d'activité AST pour 2 autres sérums. Quels sont les facteurs de multiplication respectifs permettant de calculer directement les résultats en U/L et en µkat/L à partir des valeurs de ΔA/30 s ?

QUESTION N° 5 :

Un laboratoire est équipé d'un automate multiparamétrique de biochimie utilisant des cuves de 0,6 cm de trajet optique.

Le mode opératoire retenu pour doser la concentration en activité AST avec les mêmes réactifs est le suivant :

- Réactif A : 200 µL
- Sérum : 10 µL
- Réactif B : 20 µL

L'automate calcule la variation d'absorbance moyenne par minute à partir des valeurs d'absorbance correspondant à la phase linéaire de la cinétique réactionnelle. Il rend directement la valeur de la concentration en activité AST des sérums analysés, grâce à un facteur de multiplication programmé au préalable dans le logiciel de l'automate.

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en U/L ?

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en µkat/L ?

ASAT

Aspartate + oxoglutarate \rightarrow oxaloacétate + glutamate : *Rn principale*

MDH

Oxaloacétate + NADH, H⁺ \rightarrow malate + NAD⁺ : *Rn indicatrice*

2000 μ L RA + 200 μ L sérum + 200 μ L RB \rightarrow dilution sérum = 2400/200 = 12

Absorbance à 340 nm toutes les 30 secondes

Q1

QUESTION N° 1 :

Quels sont les composants présents dans le mélange des réactifs A et B ? Préciser leur nature.
Quelles sont les conditions à respecter quant à leurs concentrations ?

Dans le mélange des réactifs A et B : aspartate / oxoglutarate / NADH, H⁺ > / MDH > – En excès (+ LDH : voir exercice 7...)

Q2

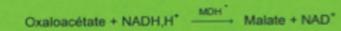
QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde et le sens de la variation d'absorbance observée.

340 nm = l.o. d'absorption du NADH, H⁺. Absorbance diminue

Enoncé

La concentration en activité aspartate aminotransférase (ASAT = AST, EC 2.6.1.1) dans le sérum est augmentée dans un certain nombre de situations (hépatites, atteintes hépatobiliaires, infarctus du myocarde, pathologies musculaires, hémolyse, ...).
Pour sa détermination, la méthode recommandée par l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) à 37 °C, à pH 7,65, en présence de phosphate de pyridoxal (PP, cofacteur des aminotransférases), utilise le principe réactionnel suivant (Clin Chem Lab Med 2002; 40:725-733) :

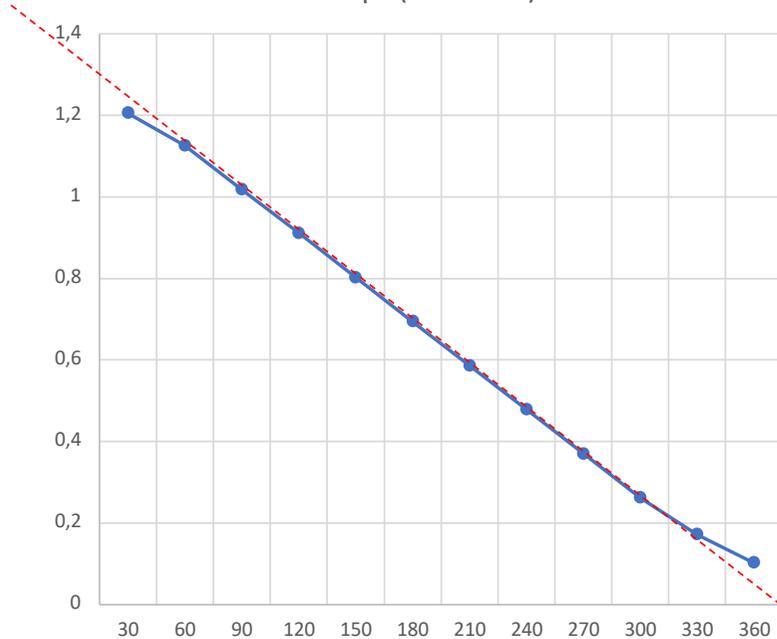


* Malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37)

Un étudiant en travaux pratiques utilise cette méthode dans la cuve réactionnelle thermostatée d'un spectrophotomètre, de trajet optique de 1 cm, selon le mode opératoire suivant :

- Introduire 2,00 mL de réactif A
- Equilibrer à 37,0 °C
- Ajouter 200 μ L de sérum
- Mélanger et incuber pendant 5 min
- Ajouter 200 μ L de réactif B (réactif déclenchant)
- Mélanger et lire les absorbances à 340 nm toutes les 30 s pendant 6 min.

Graphique de l'absorbance en fonction du temps (secondes)



QUESTION N° 3 :

Sachant que le coefficient d'absorbance molaire du NADH, H⁺ à 340 nm est de 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹, calculer la concentration en activité AST dans le milieu réactionnel final et dans le sérum, en les exprimant en U/L et en μkat/L.

Q3

CC en U/L et en μkat/L

→ Mesurer des V₀ en μmoles/min/L et en μmoles/sec/L

$$A = \epsilon LC \rightarrow C = A/\epsilon L \rightarrow \Delta C = \Delta A \times 1/\epsilon L \rightarrow \Delta C/\Delta t = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon L$$

Considérer des valeurs de A dans la zone linéaire de décroissance

$$V_0 = (0,802 - 0,694)/0,5 \times 1/6300 \times 10^6 = 0,108 \times 10^6 / 3150 = 34,29 \text{ } \mu\text{moles/L/min}$$

CC milieu réactionnel = 34,29 U/L – dans le sérum : 34,29 X 12

$$V_0 = (0,802 - 0,694)/30 \times 1/6300 \times 10^6 = 0,108 \times 10^6 / 189000 = 0,57 \text{ } \mu\text{moles/L/sec}$$

CC milieu réactionnel = 34,29 μkat/L – dans le sérum : 0,57 X 12

QUESTION N° 4 :

L'étudiant réalise, selon le même protocole, des déterminations d'activité AST pour 2 autres sérums.
Quels sont les facteurs de multiplication respectifs permettant de calculer directement les résultats en U/L et en $\mu\text{kat/L}$ à partir des valeurs de $\Delta A/30 \text{ s}$?

Q4

$$V_0 = \Delta C / \Delta t = \Delta A / \Delta t \times 1 / \epsilon L$$

Pour AE en **U/L**

$$V_0 \text{ en } \mu\text{moles/min/L} = \Delta A \text{ en } 30 \text{ sec} \times (1/6300 \times 1) \times 10^6 \times 12 \times 2 = \Delta A \text{ en } 30 \text{ sec} \times 3809,53$$

Pour AE en **$\mu\text{kat/L}$**

$$V_0 \text{ en } \mu\text{moles/sec/L} = \Delta A \text{ en } 30 \text{ sec} \times (1/6300 \times 1) \times 10^6 \times 12 \times 1/30 = \Delta A \text{ en } 30 \text{ sec} \times 63,49 (= 3809,53/60)$$

0,5 minute

30 secondes

QUESTION N° 5 :

Un laboratoire est équipé d'un automate multiparamétrique de biochimie utilisant des cuves de 0,6 cm de trajet optique.

Le mode opératoire retenu pour doser la concentration en activité AST avec les mêmes réactifs est le suivant :

- Réactif A : 200 μL
- Sérum : 10 μL
- Réactif B : 20 μL .

L'automate calcule la variation d'absorbance moyenne par minute à partir des valeurs d'absorbance correspondant à la phase linéaire de la cinétique réactionnelle. Il rend directement la valeur de la concentration en activité AST des sérums analysés, grâce à un facteur de multiplication programmé au préalable dans le logiciel de l'automate.

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en U/L ?

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en $\mu\text{kat/L}$?

200 μL de RA + 10 μL de sérum + 20 μL de RB \rightarrow dilution $230/10 = 23$

Résultats en U/L

V_0 en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{L} = \Delta C/\Delta t = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon L = \Delta A \text{ par minute} \times 10^6 \times 1/(6300 \times 0,6) \times 23 = \Delta A \text{ par minute} \times 6084,65$

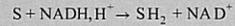
Résultats en $\mu\text{kat/L}$

V_0 en $\mu\text{moles}/\text{sec}/\text{L} = \Delta A \text{ par minute} \times 6084,65/60 = 101,41$

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 1 (40 points)****Enoncé**

La concentration catalytique d'une déshydrogénase X à cinétique michaélienne est déterminée par la mesure de la vitesse initiale en conditions conventionnelles.

La réaction catalysée est la suivante :



Le protocole opératoire retenu est :

Introduire successivement dans une cuve de spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique :

Tampon ($30 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pH 7,35)	246 μL
Solution NADH, H^+ ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/L)	49 μL
Echantillon contenant X	10 μL

Au bout de 2 minutes, on initialise la réaction par 10 μL d'une solution tamponnée du substrat S.

Note : le coefficient d'absorbance linéique molaire (ϵ) du NADH, H^+ à 340 nm est de $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Questions**QUESTION N° 1 :**

a) Pour déterminer la concentration catalytique de l'enzyme X, quelle doit être la concentration minimale de substrat S dans le milieu réactionnel si l'on souhaite mesurer plus de 90 % de l'activité enzymatique maximale ? La constante de Michaelis de X pour S est de $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

b) En déduire la concentration minimale requise de substrat dans la solution tamponnée de S.

QUESTION N° 2 :

Sachant qu'à 340 nm, l'absorbance du tampon est nulle et que l'échantillon dilué au $1/100^{\text{ème}}$ dans ce tampon présente une absorbance de 0,0305 sous 1 cm de trajet optique, quelle est l'absorbance de la solution réactionnelle avant initialisation par les 10 μL de la solution de substrat S ?

QUESTION N° 3 :

Quelles sont les valeurs des coefficients reliant la variation d'absorbance, mesurée en conditions de vitesse initiale toutes les 30 secondes à 340 nm, à la concentration catalytique de X dans l'échantillon, exprimée en U/L d'une part et en kat/L d'autre part ?

<https://www.medshake.net/pharmacie/concours-internat/Annales/>

QUESTION N° 1 :

a) Pour déterminer la concentration catalytique de l'enzyme X, quelle doit être la concentration minimale de substrat S dans le milieu réactionnel si l'on souhaite mesurer plus de 90 % de l'activité enzymatique maximale ? La constante de Michaelis de X pour S est de $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

b) En déduire la concentration minimale requise de substrat dans la solution tamponnée de S.

Q1

a)

$$S = nK_m$$

$$V_0 = V_{\max} \frac{n}{n+1}$$

$$90\% V_{\max} \rightarrow \frac{n}{n+1} = 0,9 \rightarrow n = 9 \rightarrow S = 9 \times 10^{-5} \text{ M}$$

b)

La solution tamponnée de substrat S est diluée 31,5 fois ($246 + 49 + 10 + 10 = 315$)

→ Concentration minimale dans la solution tamponnée = $9 \cdot 10^{-5} \times 31,5 = 283,5 \times 10^{-5} \text{ M}$

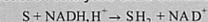
Idem échantillon contenant X

Substrat

Enoncé

La concentration catalytique d'une déshydrogénase X à cinétique michaelienne est déterminée par la mesure de la vitesse initiale en conditions conventionnelles.

La réaction catalysée est la suivante :



Le protocole opératoire retenu est :

Introduire successivement dans une cuve de spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique :

Tampon ($30 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pH 7,35)	246 μL
Solution NADH, H ⁺ ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/L)	49 μL
Echantillon contenant X	10 μL

Au bout de 2 minutes, on initialise la réaction par 10 μL d'une solution tamponnée du substrat S.

Note : le coefficient d'absorbance linéique molaire (ϵ) du NADH, H⁺ à 340 nm est de $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

QUESTION N° 2 :

Sachant qu'à 340 nm, l'absorbance du tampon est nulle et que l'échantillon dilué au 1/100^{ème} dans ce tampon présente une absorbance de 0,0305 sous 1 cm de trajet optique, quelle est l'absorbance de la solution réactionnelle avant initialisation par les 10 µL de la solution de substrat S ?

La solution de NADH,H⁺
et
l'échantillon absorbent à 340 nm

Q2

Avant initialisation par les 10 µL de S, volume total = 246 + 49 + 10 = 305 µL

- **Échantillon** = 10 µL dans 305 µL = dilué 30,5 fois

- Quand échantillon dilué 100 fois, A = 0,0305 → quand dilué 30,5 fois, A = 0,0305 X (100/30,5) = **0,1**

Avant initialisation par les 10 µL de S, volume total = 246 + 49 + 10 = 305 µL

- **solution de NADH,H⁺** à 1.10⁻³ M = 49 µL = diluée 6,224 fois → concentration = 1.10⁻³ /6,224 = 0,160.10⁻³ M

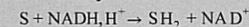
A = εLC = 6300 X 1 X 0,160.10⁻³ = **1,008**

A totale = 1,008 + 0,1 = 1,1008

Enoncé

La concentration catalytique d'une déshydrogénase X à cinétique michaélienne est déterminée par la mesure de la vitesse initiale en conditions conventionnelles.

La réaction catalysée est la suivante :



Le protocole opératoire retenu est :

Introduire successivement dans une cuve de spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique :

Tampon (30.10 ⁻³ mol/L, pH 7,35)	246 µL
Solution NADH,H ⁺ (1.10 ⁻³ mol/L)	49 µL
Echantillon contenant X	10 µL

Au bout de 2 minutes, on initialise la réaction par 10 µL d'une solution tamponnée du substrat S.

Note : le coefficient d'absorbance linéique molaire (ε) du NADH,H⁺ à 340 nm est de 6300 L.mol⁻¹.cm⁻¹

QUESTION N° 3 :

Quelles sont les valeurs des coefficients reliant la variation d'absorbance, mesurée en conditions de vitesse initiale toutes les 30 secondes à 340 nm, à la concentration catalytique de X dans l'échantillon, exprimée en U/L d'une part et en kat/L d'autre part ?

Q3

Après ajout de S (réactif déclenchant), l'échantillon est dilué 31,5 fois ($246 + 49 + 10 + 10 = 315$)

$$V_0 = \Delta C / \Delta t = \Delta A / \Delta t \times 1 / \epsilon L$$

Pour AE en U/L

$$V_0 \text{ en } \mu\text{moles/min/L} = \Delta A \text{ en 30 sec} \times (1/6300) \times 10^6 \times 31,5 \times 2 = \Delta A \text{ en 30 sec} \times 10000$$

Pour AE en Kat/L

$$V_0 \text{ en moles/sec/L} = \Delta A \text{ en 30 sec} \times (1/6300) \times 31,5 \times 1/30 = \Delta A \text{ en 30 sec} \times 1,66 \cdot 10^{-4}$$

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

ED d'enzymologie 2^{ème} année

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

Temps (en sec)	A _{340 nm}
0	1,495
10	1,490
20	1,485
30	1,480
60	1,470
90	1,468
120	1,468

On considère que le NADH, H⁺ est en large excès

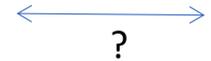
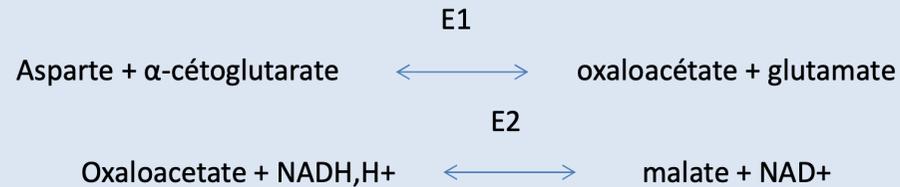
Rappel : loi de Beer Lambert $A = \epsilon.l.c$ avec A , absorbance (sans unité) ; ϵ , coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{\text{NADH,H}^+}(340 \text{ nm}) = 6,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}.\text{mole}^{-1}.\text{L}$ et l , longueur de la cuve en cm.

Questions :

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

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 -cétooglutarate (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 équivalente de NADH.

3-Le K_m de l'ASAT pour l' α -cétoglutarate est égal à $4 \cdot 10^{-5}$ 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 $\epsilon = 6,3 \cdot 10^3$ L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Attention énoncé discutable on ne connaît pas la concentration de l'autre substrat !

3. $[\alpha\text{-cétoglutarate}]_{\text{cuve}} = 144 \times (20/240) = 12$ mM soit 300 K_m . E1 est saturée, la vitesse est égale à la V_{max} . $V_0/V_{\text{max}} = (S)/[K_m + (S)] = 300/301 \approx 1$

4. $A E_{\text{échantillon}} = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon l \times \text{Vol}_{\text{tot}}/\text{Vol}_{\text{échantillon}} = (0,08/6300) \times 10^6 \times 12 = 152$ U/L

Si conditions de V_0 ...

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

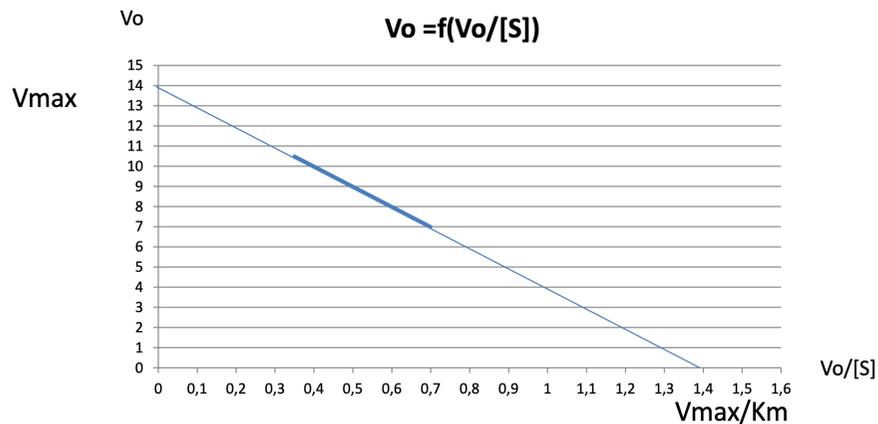
Degré de purification = AS finale/AS initiale (sans unité)

	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 (M_r) 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_o mesurées pour des concentrations en glucose dans le milieu réactionnel de 10 et 30 mM, sont respectivement de 7 et 10,5 $\mu\text{mol/L/min}$.

2- Représenter ces résultats en représentation d'Eadie- Hofstee. En déduire le K_m de la GK pour le glucose et la V_{max} .

[S]	V_o	$V_o/[S]$
10	7	0,7
30	10,5	0,35



2. Eadie-Hofstee : $V_o = f(V_o/S)$. Intersection avec l'axe des y donne V_{max} ; intersection avec x donne V_{max}/K_m ; pente = (-) K_m . On en déduit $V_{max} = 14 \mu\text{mol/L/min}$ et $K_m = 10 \text{ mM}$.

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 $[S] = a.K_m$) et **en mol/L** la concentration en glucose définie pour les conditions conventionnelles.

↗ pente

3. Tracé probable : droite parallèle puisque K_m 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: V_{max} solution B = $14 \mu\text{mol/L/min} \times 10 = 140 \mu\text{mol/L/min}$ or V_o solution B = $120 \mu\text{mol/L/min}$ en conditions conventionnelles

$V_o / V_{max} = a / (a + 1) = 6/7$. On en déduit $a = 6$, et donc $(S) = 6 K_m = 60 \text{ mM}$ 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 $[E]_{\text{tot}} = [\text{protéine}]_{\text{totale}}$

On calcule K_{cat} à partir de la relation $K_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/(E_{\text{t}})$ avec $V_{\text{max}} = 140 \cdot 10^{-6}$
 mol/L/min et $[E]_{\text{tot}} = 6 / 35000 = 171,4 \cdot 10^{-6} \text{ mole/L}$. Donc $K_{\text{cat}} = 0,817 \text{ min}^{-1}$.

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 = $\frac{\text{conc. catalytique}}{\text{conc. en protéines totales}}$ (U/g)

Degré de purification = $\frac{AS_{\text{finale}}}{AS_{\text{initiale}}}$

a- 30 %

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

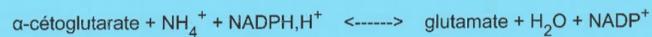
c- 500

- Bien lire et comprendre l'énoncé
- Enzymologie = expérimental : on fait des mesures dans des conditions particulières et on en tire des données intéressantes
- Connaitre les formules importantes
- Une U d'enzyme dans un labo n'est pas forcément équivalente à l'U du labo d'à côté (pas de calibration ; importance des valeurs normales ; standardisation)
- Bien comprendre les représentations graphiques
- Inhibitions enzymatiques
- Attention aux dilutions !
- Un exercice d'enzymologie par semaine
- Ne pas faire l'impasse (0 = interdit)

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION
Exercice N° 3 (40 points)

Enoncé

La glutamate déshydrogénase (GLDH, EC 1.4.1.3) catalyse la réaction suivante :



On utilise la GLDH pour doser la concentration en ion ammonium dans le plasma.
 On se place dans des conditions de vitesse initiale (v_0) telles que la réaction soit d'ordre 1 par rapport au substrat S à doser (ici l'ion ammonium) : $v_0 = k \times [S]$.
 Donnée : K_m de l'ion ammonium pour la GLDH = 6,5 mM.

Le protocole du dosage est le suivant :
 20 μL de plasma sont ajoutés à 180 μL de diluant contenant de l' α -cétoglutarate et du NADPH, H^+ .
 La réaction est initialisée ($t = 0$) par l'addition de GLDH lyophilisée.
 La consommation en substrat est suivie par la mesure dans la cuve réactionnelle (trajet optique = 1 cm) de l'absorbance à 340 nm, aux temps 30 secondes (t_1) et 60 secondes (t_2) après addition de la GLDH.
 Les concentrations au temps $t = 0$ dans la cuve réactionnelle sont les suivantes :
 $[\alpha\text{-cétoglutarate}] = 9,2 \text{ mM}$; $[\text{NADPH, H}^+] = 240 \mu\text{M}$; $[\text{GLDH}] = 4000 \text{ U.L}^{-1}$.

N.B. : toutes les questions sont indépendantes.

Questions

QUESTION N° 1 :

En considérant l'équation de Michaelis-Menten, préciser les conditions (théorique et pratique) à respecter pour que la vitesse soit d'ordre 1 par rapport à la concentration en substrat S.

QUESTION N° 2 :

Quelle est l'absorbance théorique au temps $t = 0$ (après addition de la GLDH), sachant que le coefficient d'extinction molaire (coefficient d'absorbance linéique molaire) du NADPH, H^+ à 340 nm est de $6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et qu'aucun autre composant du milieu réactionnel n'absorbe à cette longueur d'onde ?

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION
Exercice N° 3 (40 points)

QUESTION N° 3 :

Sachant que dans les conditions du dosage, les K_m de la GLDH pour l' α -cétoglutarate et le NADPH, H^+ sont respectivement de 0,5 mM et 0,012 mM, exprimer les concentrations de ces réactifs (en unités K_m) dans la cuve réactionnelle. Commenter les résultats.

QUESTION N° 4 :

En prenant comme limite supérieure de validité du dosage une concentration en ion ammonium dans la cuve réactionnelle inférieure à 0,1 K_m , quelle serait la valeur maximale de la concentration en ammonium plasmatique que l'on pourrait doser selon le protocole ci-dessus ?

<https://www.medshake.net/pharmacie/concours-internat/annales/>