

Une enzyme est purifiée à partir d'un homogénat de 500 mL placenta contenant 15 g de protéines totales. La quantité catalytique mesurée dans les conditions conventionnelles dans cet homogénat est de 45000 U. Après une première étape de purification par chromatographie d'exclusion on recueille 2 litres de solution contenant 0.06 g de protéines et une concentration catalytique 1500 U/L.

- 1) Calculer le rendement et le degré de purification de l'enzyme lors de cette première étape. (14 points)

Activité Spécifique initiale = quantité catalytique/quantité de protéines tot

$$= 45\ 000/15 = 3\ 000\ \text{U/g}$$

AS finale = conc catalytique /conc protéine tot

$$= 1500/0.03 = 50\ 000\ \text{U/g}$$

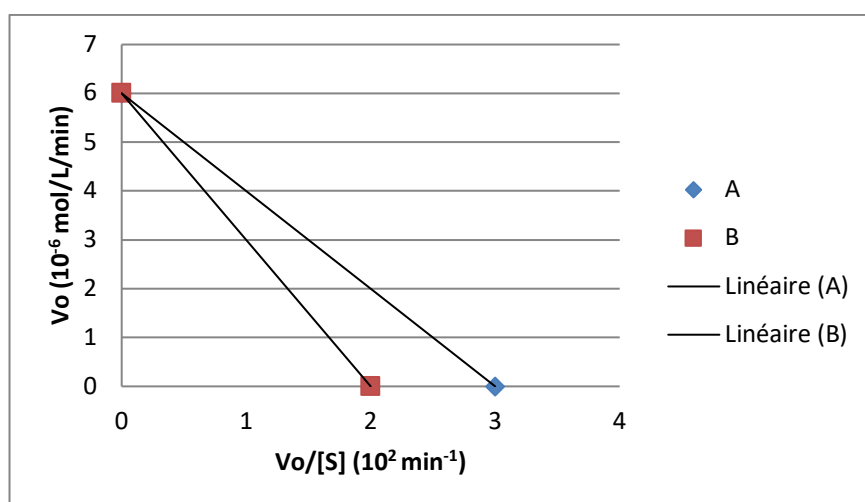
Rendement = qtté catalytique finale /qtté catalytique initiale x 100

$$= 1\ 500 \times 2 / 45\ 000 = 6,67\%$$

Degré de purification = AS finale/AS initiale

$$= 50\ 000 / 3\ 000 = 16,67\ (\text{sans unité})$$

- 2) Après plusieurs autres étapes de purification la solution obtenue est analysée dans de nouvelles conditions permettant la mesure d'une vitesse initiale. Plusieurs séries de mesures sont réalisées en absence (A) ou en présence (B) d'un inhibiteur à la concentration finale de $3 \cdot 10^{-5}$ M. A partir de ces séries de mesures, la représentation suivante des variations des vitesses initiales mesurées est obtenue :



- A partir de l'équation de Michaelis Menton, retrouver l'équation générale de la droite A (4 points).

$$V_o = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{V_o}{[S]} \cdot (K_m + [S]) = V_m \rightarrow \frac{V_o}{[S]} \cdot K_m + V_o = V_m \rightarrow V_o = V_m - K_m(V_o/[S])$$

(représentation d'Eadie)

- En déduire les expressions de la pente et des intersections avec les axes des ordonnées et des abscisses (3 points).

Intersections avec $y = V_m$, avec $x = V_m/K_m$ et pente = $-K_m$

- Calculer la constante de Michaelis de l'enzyme pour le substrat testé (3,5 points).

$$V_m/K_m = 3 \cdot 10^2 \text{ min}^{-1} \text{ et } V_m = 6 \text{ } \mu\text{mol/l/min} \rightarrow K_m = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

3) Quel est le type d'inhibition exercé par l'inhibiteur (hypothèse de l'équilibre rapide) (3,5 points).

L'inhibiteur qui n'affecte pas la vitesse maximale mais augmente le K_m ($K_{m \text{ app}} = 6/2 = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) donc diminue l'affinité de l'enzyme pour son substrat est un inhibiteur compétitif.

- Calculer la constante de dissociation de l'inhibiteur pour le complexe enzyme-inhibiteur (4 points).

$$K_{m \text{ app}} = K_m (1 + [I]/K_i) \rightarrow 3 \cdot 10^{-4} = 2 \cdot 10^{-4} (1 + 3 \cdot 10^{-5}/K_i) \Rightarrow K_i = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

4) Donner le principe de la démonstration de (ne pas faire toutes les étapes de la démonstration vous n'aurez pas le temps) l'expression donnant le degré d'inhibition pour ce type d'inhibiteur. (4 points)

- expliquer le sens de sa variation lorsque l'on double la quantité de substrat. (4 points)

Degré inhibition = $V_o - V_i / V_o$ il faut remplacer V_o et V_i par l'expression de Michaelis Menton en remplaçant pour V_i , K_m par $K_{m \text{ app}}$ ($V_{m \text{ app}} = V_m$).

Pour mémoire et ceux qui aurait tenté la démonstration :

$$= \frac{\frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} - \frac{V_{m \text{ app}} \cdot [S]}{K_{m \text{ app}} + [S]}}{\frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}} = \frac{\frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} - \frac{V_m \cdot [S]}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]}}{\frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}}$$

On multiplie le tout par $\frac{K_m + [S]}{V_m \cdot [S]}$ (ramène le dénominateur à 1

Degré inhibition = $V_o - V_i / V_o = 1 - \frac{K_m + [S]}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]}$ on met au même dénominateur

$$= \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] - K_m - [S]}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]} = \frac{K_m \cdot [I]/K_i}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]} \text{ on divise les deux membres par } K_m$$

$$= \frac{[I]/K_i}{1 + [I]/K_i + [S]/K_m} \text{ on multiplie les deux membres par } K_i \rightarrow = \frac{[I]}{[I] + K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)}$$

- dans une inhibition compétitive, le substrat et l'inhibiteur partageant le même site et la fixation de l'un excluant l'autre, si l'on augmente la concentration en substrat sans changer la

concentration en inhibiteur alors l'inhibiteur est déplacé par le substrat et le degré d'inhibition diminue (pas directement proportionnel cf expression finale)