

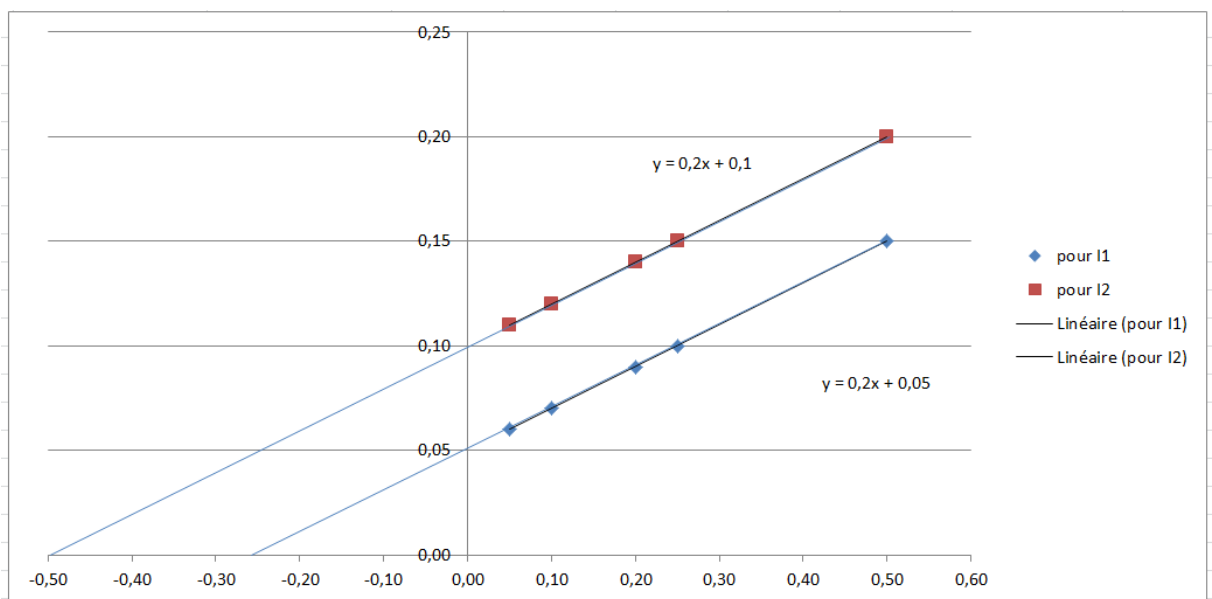
L'étude cinétique d'une enzyme michaelienne E, de masse moléculaire 30 000 Da, est réalisée pour différentes concentrations en substrats [S] en présence de concentrations fixes ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/L) d'un inhibiteur compétitif (I_1) ou d'un inhibiteur non compétitif (I_2). Les mesures d'activité enzymatique spécifique sont rapportées dans le tableau suivant :

[S] x10 ⁻⁶ M	Vo (I_1) x 10 ⁻⁶ mol/min/mg	Vo (I_2) x 10 ⁻⁶ mol/min/mg
2	6,67	5,00
4	10,00	6,67
5	11,11	7,14
10	14,29	8,33
20	16,67	9,09

- 1) Déterminer graphiquement les valeurs des K_m et V_{max} apparentes en présence de l'inhibiteur I_1 et de l'inhibiteur I_2 . (vous exprimerez les V_m apparentes dans la même unité que les vitesses initiales du tableau)
- 2) Donner les valeurs de K_m et V_m en l'absence d'inhibiteur (justifier votre réponse)
- 3) Calculer les constantes de dissociation des complexes EI pour chacun des deux inhibiteurs
- 4) Calculer la constante catalytique en l'absence d'inhibiteur
- 5) Comment évolue cette valeur en présence de l'inhibiteur compétitif (I_1).

- 1) Représentation graphique la plus simple est celle des doubles inverses (LB) :
 $1/V_o = f(1/[S])$ (14 points si complète)

[S] x10 ⁻⁶ M	1/*[S]	V _o (I ₁) x 10 ⁻⁶ mol/min/mg	1/V _o (I ₁)	V _o (I ₂) x 10 ⁻⁶ mol/min/mg	1/V _o (I ₂)
2,00	0,50	6,67	0,15	5,00	0,20
4,00	0,25	10,00	0,10	6,67	0,15
5,00	0,20	11,11	0,09	7,14	0,14
10,00	0,10	14,29	0,07	8,33	0,12
20,00	0,05	16,67	0,06	9,09	0,11



(mettre les légendes des axes et des points remarquables (1/V_m et -1/K_m) 5 points par courbe et 4 points pour le titre et les légendes (axes, points remarquables...))

- 2) (6 points, décomposés par formule, résultat numérique, unité)

a. Pour I₁ (inhibiteur compétitif) on obtient :

$V_m \text{ app} = 1/0,05 = 20 \cdot 10^{-6} \text{ mol/min/mg}$ (1.5 point)

$K_m \text{ app} = -1/0,25 = 4 \mu\text{mol/L}$ (1.5 point)

b. Pour I₂ (inhibiteur non compétitif), on obtient :

$V_m \text{ app} = 1/0,1 = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol/min/mg}$ (1.5 point)

$K_m \text{ app} = -1/0,5 = 2 \mu\text{mol/L}$ (1.5 point)

- 3) (4 points, décomposés par formule, résultat numérique, unité) En présence d'un inhibiteur compétitif seule la fixation du substrat est affecté, la vitesse maximale n'est pas affectée : $V_{\text{max}} = 20 \cdot 10^{-6} \text{ mol/min/mg}$ (2 points)

En présence d'un inhibiteur non compétitif, la fixation du substrat et de l'inhibiteur sont indépendantes, le K_m n'est pas affecté $K_m = 2 \mu\text{mol/L}$. (2 points)

4) (6 points, décomposés par formule, résultat numérique, unité)

- Pour I1, inhibiteur compétitif, $K_m \text{ app} = K_m \times (1 + [I]/K_i)$

$$4 = 2(1 + 2/K_i) \rightarrow K_i = 2 \mu\text{mol/L} \text{ (3 points)}$$

Pour I2 inhibiteur non compétitif $V_m \text{ app} = V_m / (1 + [I]/K_i)$

$$10 = 20 (1 + 2/K_i) \rightarrow K_i = 2 \mu\text{mol/L} \text{ (3 points)}$$

5) (6 + 4 points)

$V_{\text{max}} = K_{\text{cat}} \cdot [\text{Etot}]$ (1 point). On connaît V_{max} pour 1mg d'enzyme ($20 \cdot 10^{-6}$ mol/min/mg) et on connaît la masse moléculaire de l'enzyme 30 kDa

$$K_{\text{cat}} = 20 \cdot 10^{-6} / (1 \cdot 10^{-3} / 30\,000) = 600 \text{ min}^{-1} \text{ (5 points)}$$

K_{cat} ne change pas en présence d'un inhibiteur compétitif puisque la V_{max} n'est pas affectée, seule la liaison du substrat est affectée (% d'inhibition = $I/(I+K_i)$). (4 points)