Une enzyme E catalyse la réduction d’un substrat X1 selon la réaction suivante :

X1 + NADH, H+ 🡪 X1H2 +NAD

Pour suivre cette réaction, vous mélangez dans une cuve optique de 1 cm de large, 270 µL d’un tampon T adapté avec 10 µL d’un échantillon biologique contenant l’enzyme E et 20 µL d’une solution de NADH de concentration 2,50 mM, l’ensemble est pré-incubé 5 minutes à 37°C puis la réaction est déclenchée par l’ajout de 20 µL d’une solution de substrat X1 à la concentration de 160 µM. L’échantillon biologique présente une absorbance à 340 nm de 0,2 lorsqu’il est dilué au 1/50ème dans le tampon T. Le Km de l’enzyme E pour le substrat X1 est de 2 µM. La vitesse initiale mesurée dans la cuve est de 275 µmol/L/min. Le coefficient molaire d’absorbance du NADH à 340 nm est de 6300 L.mol-1.cm-1

1. Calculer l’absorbance du mélange avant l’ajout du substrat X1.

*Attention : avant l’ajout du substrat le volume de préincubation est de 300 µL (270+10+20) soit une dilution de la solution de NADH de 20/300 (1/15) et pour l’échantillon 10/300 (1/30).*

*Rappel : additivité de la loi de beer lambert*

Absorbance du mélange = Abs échantillon + Abs NADH 2 points

 = 0.2 x 50/30 + 2.5 10-3 x 1/15 x 6300

 = 0.333 + 1.05 2 points (1 pour chacune des absorbances si calculée séparément)

 = 1.383 1 points

1. Calculer la concentration catalytique de l’enzyme E (en U/L) dans l’échantillon biologique.

*Attention cette fois ci le volume réactionnel est le volume total après ajout de 20 µL de X1, soit 320 µL.*

Concentration Catalytique ech = Concentration Catlytique cuve x Vol tot/vol ech 2 points

= 275 x 320/10 = 8 800 U/L 2 points

1. Calculer la Vmax dans la cuve.

Vo est de 275 µmol/L/min pour [X1] = 160 x 20/320 = 10 µM soit 5.Km donc Vm = 275 x 6/5 =330 µmol/L/min 5 points

1. Un inhibiteur I est ajouté dans le tampon à la concentration de 1 mM. La vitesse de la réaction dans la cuve en présence de l’inhibiteur I en fonction de la concentration en X1 donne les résultats suivants :

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Voinhib µmol/L/min | 14 | 35 | 55 | 72 | 81 | 90 | 100 | 109 | 110 |
| [X1] µM | 0,1 | 0,35 | 0,67 | 1,3 | 2 | 3,3 | 6,5 | 65 | 100 |

Déduisez-en le comportement de l’inhibiteur I pour cette réaction. Vous devez justifier votre réponse.

On constate que Vmax app est d’environ 110 µmol/L/min et Km app environ 0.67 µM 3 points

Or Vm = 330 µmol/L/min et Km = 2 µM. Km app et Vm app diminuent d’un même facteur (égal à 3) en présence de l’inhibiteur : I se comporte donc comme un inhibiteur incompétitif vis-à-vis de X1 pour l’enzyme E 4 points

1. Comment évolue le pourcentage d’inhibition si l’on augmente la concentration en X1 ?

*Attention comment évolue ne demande pas de calculer exactement le % d’inhibition, une réponse qualitative est suffisante, si cela n’est pas demander le calcul ne rapportera rien.*

En cas d’inhibition incompétitve le pourcentage d’inhibition augmente quand la concentration en substrat augmente (je ne demande pas de calcul) mais juste une tendance vous pouvez donner la formule pour expliciter votre propos (pas obligatoire car pas de demande de justification) 3 points

1. La même enzyme E peut réagir avec un second substrat X2 dans les mêmes conditions opératoires (mêmes volumes et même concentration en substrat), le Km du couple (E, X2) est de 8 µM et la Kcat est deux fois plus grande que celle du couple (E, X1). Comparer l’efficacité enzymatique de l’enzyme E pour X1 et X2.

Efficacité enzymatique = Kcat/Km 2 points

pour X1 Eff enz = KcatX1/2 2 points

pour X2 Eff enz = 2 x KcatX1/8 =KcatX1/4. 2 points

L’enzyme est donc deux fois plus efficace pour le substrat X1 que pour le substrat X2 2 points

1. Calculez dans les mêmes conditions opératoires la concentration catalytique (en U/L) dans la cuve pour [X2] = 0,04 mM

[X2] = 40 µM = 5.Km 2 points

La Kcat X2 = 2 x Kcat X1 donc Vmax X2 = 2x Vmax X1 2 points

Si on applique l’équation de HMM :

Vo X2 = Vm X2 x 5/6 = 330 x 2 x5/6 = 550 µmol/L/min donc CC X2 cuve = 550 U/L 4 points