L’étude de l’activité d’une enzyme de masse moléculaire = 60 kDa en fonction de la concentration en substrat [S] en absence condition A et en présence de concentrations fixées (I) = 500 µM d’un inhibiteur, condition B, est réalisée. Les résultats de ces mesures sont donnés dans le tableau suivant :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [S] µM | VoA µmol/min/mg | VoB µmol/min/mg |
| 3 | 2,308 | 0,923 |
| 5 | 3,333 | 1,333 |
| 10 | 5 | 2 |
| 20 | 6,667 | 2,667 |
| 25 | 7,143 | 2,857 |

Rq : Les vitesses sont ici rapportées au mg d’enzyme contenu dans le mélange réactionnel

1 – Choisissez une représentation graphique permettant de déterminer graphiquement Km et Vmax (justifier votre choix) et représentez les deux courbes (en présence et absence d’inhibiteur) sur le même graphe (papier millimétré fourni).

2 – Déterminer les Km et Vmax avec ou sans inhibiteur (arrondissez les valeurs retrouvées si nécessaire) .

3 – en déduire le mode d’action de l’inhibiteur (expliquer votre résultat).

4 - Calculer les constantes de dissociation du complexes EI.

5 – déterminer la concentration d’inhibiteur donnant 50% d’inhibition dans les mêmes conditions

6 - Calculer la constante catalytique (kcat) de l’enzyme en l’absence et en présence de chaque inhibiteur.

Propositions de correction (notée sur 20 points)

1. (2 points) - 2 choix possibles (LB et Eadie) qui donnent **des droites** avec **lecture directe** (ou presque pour Eadie) des valeurs recherchées, le plus simple est le LB 1/Vo =f(1/S) ou alors la représentation d’Eadie Vo = (Vo/S)

- Donnez les valeurs dans un tableau !!! Combien de graphes mauvais mais aucune valeur fournie…

- Faites apparaitre vos points remarquables (ici non fait sur excell)

Tableau de valeur pour établir la représentation graphique de Lineweaver Burk

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| [S] µM | **1/[S]** | VoA µmol/min/mg | **1/VoA** | VoB µmol/min/mg | **1/VoB** |
| 3 | **0,333** | 2,308 | **0,433** | 0,923 | **1,083** |
| 5 | **0,2** | 3,333 | **0,300** | 1,333 | **0,750** |
| 10 | **0,1** | 5 | **0,2** | 2 | **0,5** |
| 20 | **0,05** | 6,667 | **0,150** | 2,667 | **0,375** |
| 25 | **0,04** | 7,143 | **0,140** | 2,857 | **0,350** |

Tableau de valeurs pour Eadie :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| VoA µmol/min/mg | VoA/S | VoB µmol/min/mg | VoB/S |
| 2,31 | **0,77** | 0,92 | **0,31** |
| 3,33 | **0,67** | 1,33 | **0,27** |
| 5,00 | **0,50** | 2,00 | **0,20** |
| 6,67 | **0,33** | 2,67 | **0,13** |
| 7,14 | **0,29** | 2,86 | **0,11** |

2) (4 points pour graphe +/- tableau) (4points pour les Km et Vm) Graphiquement on obtient par LB, condition A :

-1/Km = -0.1 🡪 Km = 10 µM

1/Vm = 0.1 🡪 Vm = 10 µmol/min/mg

En présence d’inhibiteur, condition B :

-1/Kmapp = -0.1 🡪 Kmapp = 10 µM

1/Vmapp = 0.25 🡪 Vmapp = 4 µmol/min/mg

Par Eadie lecture directe des Vm (ordonnée à l’origine) et calcul de Km à partir de l’intersection avec l’axe des abscisses : Vm/Km (ne pas changer les unités mettre µmol/min/mg/µM). **Attention Km est toujours dans la même unité que le substrat** !!

1. (2 points si explication)

Un inhibiteur qui n’affecte pas l’affinité de l’enzyme pour son substrat (Km=Kmapp) et diminue la vitesse maximale ou la constante catalytique (Vmapp<Vm) se comporte comme un inhibiteur non compétitif. L’inhibiteur et le substrat se lie sur des sites Independents, la fixation de l’un n’affecte pas l’autre, en revanche il y a formation d’un complexe ESI non productif, la constante catalytique diminue.

1. (3 points)

En présence d’un inhibiteur compétitif on obtient :

Vmapp = Vm/ (1+[I]/ki))

[I]/Ki = Vm/Vmapp – 1

Ki= [I]/(Vm/Vmapp-1)

Ki = 500/(10/4 -1) = 333,3 µM

1. (2 points)

L’IC50 pour un inhibiteur compétitif et obtenue pour [I]=Ki car le % d’inhibition est de la forme [I]/([I]+Ki)

[I]/( [I]+Ki) = 0.5 🡪 [I]=Ki = 333, 3 µM

6) (3 points)

**Comme les vitesses sont données en µmol/min/mg se apporter directement à 1 mg d’enzyme**

Vm = Kcat.[Etot]

Sans inhibiteur Kcat = = 600 min-1

En présence de l’inhibiteur : Kcatapp = = 240 min-1