Vous purifiez une enzyme E à partir de pancréas humain, après broyage des pancréas vous obtenez 300 mL d’une solution contenant 150 g de protéines totales et une quantité catalytique de 50 000 U. Après plusieurs étapes de purification vous vous retrouvez avec 600 mL d’une solution contenant 5 g de protéines totales et une quantité catalytique de 9 000 U.

1. Calculer le rendement et le degré de purification.

Vous étudiez ensuite, sur votre produit de purification, l’effet d’un inhibiteur I. Pour cela vous effectuez des mesure d’activité enzymatique en conditions de vitesse initiale pour différentes concentrations en substrat en l’absence ou en présence de l’inhibiteur à la concentration de 2 mM. Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Substrat  (mM) | Vo sans inhibiteur (µmol/L/min) | Voi avec inhibiteur (µmol/L/min) |
| 0.5 | 25 | 20 |
| 1 | 41.67 | 33.33 |
| 5 | 89.286 | 71.429 |
| 20 | 113.636 | 90.91 |

1. Tracer les courbes selon la représentation de Lineweaver-Burk et déduisez en le Km et la Vmax de l’enzyme en l’absence et en présence de l’inhibiteur.
2. Quel est le mode d’action de l’inhibiteur I sur l’enzyme E (justifiez-vous) ?
3. Déterminer la constante de dissociation de l’inhibiteur I pour le couple (E, I)

Propositions succinctes de correction :

1. L’énoncé donnait toutes les données directement exploitables (des quantités catalytiques et des quantités de protéines, ici les volumes ne servaient à rien, sauf pour ceux qui ont calculé les activités spécifiques en passant par le rapport des concentrations catalytique sur protéique)

Rendement = quantité catalytique finale/quantité catalytique initiale x 100 (%)

= (9000/50000) x 100 =18% (4 points)

Degrés de purification = AS finale/AS initiale

nécessite de calculer les activités spécifiques initiale et finale :

Activité Spécifique initiale = 50 000/150 = 333.3 U/g, AS finale = 9 000 /5 = 1 800 U/g

degrés de purification = 5,4 (sans unités) (6 points)

2) graphique (12 points)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Substrat  (mM) | 1/S | Vo sans inhibiteur (µmol/L/min) | 1/Vo | Voi avec inhibiteur (µmol/L/min) | 1/Voi |
| 0.5 | 2 | 25 | 0,04 | 20 | 0,05 |
| 1 | 1 | 41.67 | 0,024 | 33.33 | 0,03 |
| 5 | 0,2 | 89.286 | 0,011 | 71.429 | 0,014 |
| 20 | 0,05 | 113.636 | 0,0088 | 90.91 | 0,011 |

Projection sur ligne des abscisses (qui ne figure pas sur mon graphique mais doit figurer sur le votre) : -1/Km = -0.5 avec ou sans inhibiteur donc Km = Km app = 2 mM (4 points)

Projection sur ligne des ordonnées : 1/Vm = 0.008 soit Vmax = 125 µmol/L/min (sans inhibiteur)

1/Vm app = 0.01 soit Vmax app = 100 µoml/L/min (6 points)

3) l’inhibiteur n’affecte pas l’affinité de l’enzyme pour son substrat (Km=Km app) mais affecte la catalyse en diminuant la vitesse maximale. I se comporte donc comme un inhibiteur non compétitif par rapport à S pour E. I et S se fixent sur des sites indépendants l’un de l’autre (ou la fixation de S n’influence pas celle de I, et réciproquement, les deux sites sont différents) (4 points)

4) Vm app = Vm / (1+[I]/Ki)

Après développement du calcul on obtient (toutes les données étaient disponibles sauf Ki)

Ki = 8 mM (4 points)

*Rq : J’ai noté le graphe sur beaucoup de points et ai ajuster la note en fonction de l’exactitude des courbes obtenues car c’était le plus long à faire dans cet exo. Mais j’ai mis tous les points sur la lecture des Km et Vmax obtenues tant qu’elles restaient à +/- 15-20% de la valeur attendues et, bien sûr, j’ai tenu compte des valeurs de Vm et Vmapp de chacun pour le calcul du Ki ce qui explique que certains (beaucoup) ont eu tous les points à cette dernière question avec des valeurs de Vm et Vmapp légèrement différentes de celles données ici).*

*Attention beaucoup se sont bêtement trompé en plaçant leurs points sur le graphe ce qui rend toute la suite de l’exercice erronée !*