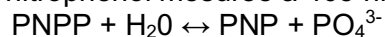


EXERCICE N° 3 (40 points)

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse des esters phosphoriques en milieu basique. On étudie l'activité de cette enzyme par l'hydrolyse du para-nitrophénylphosphate (PNPP) avec libération de para-nitrophénol mesurée à 405 nm :



Des mesures d'activité enzymatique sont réalisées, dans des conditions bien définies, en présence de différentes concentrations de PNPP, dans le but d'établir les constantes catalytiques de la Pal vis-à-vis de ce substrat. Les résultats obtenus sont analysés par linéarisation selon la représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk.

L'équation obtenue est la suivante : $y = 0,052 x + 0,240$ avec $Y = 1/v_0$ (v_0 = activité enzymatique en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) et $x = 1/S$ (S = concentration en PNPP en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

QUESTION N°1 :

- A partir de l'équation de Michaelis-Menten, écrire les étapes de transformation permettant d'établir l'équation de Lineweaver-Burk (sans valeur numérique).
- Déterminer le K_m de la PAL pour le PNPP.
- Déterminer la vitesse maximale correspondant à la concentration de PAL dans le milieu réactionnel.

QUESTION N°2 :

La même série d'expériences est réalisée en présence de phosphate ajouté au milieu réactionnel. Les résultats obtenus, dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment sont les suivants :

- en présence de $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de phosphate : $y = 0,098x + 0,240$

- Déterminer, en justifiant votre réponse, le type d'inhibition exercé par le phosphate sur l'activité PAL.
- Calculer la constante d'inhibition K_i du phosphate pour la PAL.

REPONSE QUESTION N°1 :

- a) A partir de l'équation de Michaelis-Menten, écrire les étapes de transformation permettant d'établir l'équation de Lineweaver-Burk (sans valeur numérique). (6 pts)

$$V_o = V_m \frac{S}{K_m + S} \quad \frac{1}{V_o} = \frac{K_m + (S)}{V_m \cdot (S)} \quad \frac{1}{V_o} = \frac{k_m}{v_m} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_m}$$

- b) Déterminer le K_m de la PAL pour le PNPP. (6 pts)

Dans la représentation de LB pour $y=0$ on obtient $x = -1/K_m$
si l'on remplace dans l'équation $y = 0,052 x + 0,240$ cela donne :
 $1/K_m = 0.24/0.052 = 4.61$ donc $K_m = 0.22$ mM

- c) Déterminer la vitesse maximale correspondant à la concentration de PAL dans le milieu réactionnel. (6 pts)

Pour $x=0$ alors $y=1/V_m \rightarrow 1/V_m = 0.24$ donc $V_m = 4,17$ $\mu\text{mol/L/min}$

REPONSE QUESTION N°2 :

La même série d'expériences est réalisée en présence de phosphate ajouté au milieu réactionnel. Les résultats obtenus, dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment sont les suivants :

- en présence de 0,5 mmol. L⁻¹ de phosphate : $y = 0,098x + 0,240$

- a) Déterminer, en justifiant votre réponse, le type d'inhibition exercé par le phosphate sur l'activité PAL. (8,0 pts)

En présence de phosphate, l'ordonnée à l'origine reste identique, la pente augmente, ce qui signifie que V_m reste identique et que K_m augmente. Le phosphate qui diminue l'affinité de l'enzyme pour son substrat sans affecter la V_{max} se comporte comme un inhibiteur compétitif vis-à-vis du PNPP pour la PAL.

- b) Calculer la constante d'inhibition K_i du phosphate pour la PAL. (14,0 pts)

En présence de l'inhibiteur :

comme pour la question 1 on calcule le $K_{mapp} \Rightarrow 1/K_{mapp} = 0.24/0.098$ d'où $K_{mapp} = 0.408$ mM

$$K_{mapp} = k_m \times (1 + (I)/K_i) \rightarrow (K_{mapp} - K_m) / K_m = (I) / K_i$$

$$K_i = (I) \cdot K_m / (K_{mapp} - K_m)$$

Application numérique :

$$K_i = 0.57 \text{ mM}$$