

Enzymologie

Pour l'étude de l'inhibiteur I non compétitif de l'enzyme E (de masse moléculaire de 300 kDa) en présence du substrat S on effectue des mesures de la vitesse initiale en conditions conventionnelles pour $[S] = 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ à partir d'une solution d'enzyme $[E] = 1,65 \text{ mg/L}$.

- en présence de l'inhibiteur $[I] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ $V_{oi} = 120 \text{ } \mu\text{mol/L/min}$

- l'absence d'inhibiteur $[I] = 0$ $V_o = 200 \text{ } \mu\text{mol/L/min}$

La concentration catalytique obtenue, en l'absence d'inhibiteur, à concentration saturante de substrat (les autres conditions opératoires étant identiques,) est de 3667 nkat/L

- 1) Calculer le K_m du couple enzyme substrat
- 2) Calculer la constante catalytique en l'absence d'inhibiteur. Sans faire de calcul indiquer comment celle-ci évolue en présence de l'inhibiteur
- 3) Calculer la constante d'inhibition (K_i) de l'inhibiteur I pour l'enzyme
- 4) Quelle serait la vitesse initiale mesurée pour $[S] = 8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ et $[I] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
- 5) Dans ces mêmes conditions expérimentales déterminer la concentration d'inhibiteur I donnant 50% d'inhibition.

CORRECTION

1) Calculer le Km du couple enzyme-substrat

(10 points)

AE max = 3667 nkat/L à convertir en vitesse pour être exploitable

soit $V_m = 3667 \cdot 60 \cdot 10^9 \text{ mol/L/minute} = 220 \text{ } \mu\text{mol/L/min}$ (ou AE max = 220 U/L) (4 pts)

D'après HMM $V_o = V_m \cdot \frac{S}{(K_m + [S])}$

soit $200 = 220 \times 8 / (K_m + 8)$

$K_m + 8 = 1760/200$

$K_m = 8,8 - 8 \rightarrow K_m = 0,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$

(mol/L car c'est une concentration, celle pour laquelle on obtient $V_m/2$, donc à mettre dans la même unité que les concentrations en substrat. On pouvait utiliser $8 \cdot 10^{-4}$ pour [S] mais j'ai préféré simplifier le calcul. (6 pts)

2) Calculer la constante catalytique en l'absence d'inhibiteur. Sans faire de calcul indiquer comment celle-ci évolue en présence de l'inhibiteur.

(9 points)

$[E]_{\text{tot}} = [E \text{ g/L}] / \text{masse moléculaire} = 1,65 \cdot 10^{-3} / 300000 = 5,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$ (3 pts)

$V_m = K_{\text{cat}} \cdot [E]_{\text{tot}}$ $K_{\text{cat}} = 220 \cdot 10^{-6} / 5,5 \cdot 10^{-9}$

$K_{\text{cat}} = 40000 \text{ min}^{-1}$ (4 pts)

Dans le cas d'un inhibiteur non compétitif, le complexe EIS est non productif par conséquent la constante catalytique apparente diminue.

(rappel : c'est le nombre de molécule de substrat transformée par molécule d'enzyme par unité de temps, si une partie de l'enzyme est sous forme non productive, la quantité de substrat transformée diminue) (2 pts)

3) Calculer la constante d'inhibition K_i

(9 points)

On applique l'équation de HMM en présence d'un inhibiteur :

$V_o = V_{\text{mapp}} (S / (K_{\text{mapp}} + S))$ avec dans le cas d'un inhibiteur non compétitif $K_{\text{mapp}} = K_m$ et $V_{\text{mapp}} = V_m / (1 + I / K_i)$

V_o est donné pour $[I] = 2 \cdot 10^{-4}$ dans l'énoncé $120 \text{ } \mu\text{mol/L/min}$; V_{mapp} est calculée dans la question 1 ($220 \text{ } \mu\text{mol/L/min}$), $[S] = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (énoncé) seul K_i est inconnu. (5 pts)

$120 = [220 / (1 + I / K_i)] \cdot (9/10)$

$K_i = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$

(rappel $K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$ c'est donc l'unité d'une concentration) (4 pts)

4) Quelle serait la vitesse initiale mesurée pour $[I] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$

(6 points)

On utilise la formule du % inhibition dans le cas d'un inhibiteur non compétitif :

$(V_o - V_{oi}) / V_o = I / (I + K_i)$ pour $[I] = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ $V_{oi} = 66,67 \text{ } \mu\text{mol/L/min}$

(Rappel dans une inhibition non compétitive S et I se fixent indépendamment l'un de l'autre sur des sites différents, le % d'inhibition ne dépend donc pas de S et l'inhibition ne peut jamais être levée par un excès de substrat)

5) Dans ces mêmes conditions expérimentales déterminer la concentration d'inhibiteur I donnant 50% d'inhibition (6 points)

C'est l'IC50, elle est obtenue pour $[I]=K_i$ selon la formule du % d'inhibition pour un inhibiteur non compétitif : $I/I + K_i = 1/2$

Donc pour avoir 50% d'inhibition il faut $[I] = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$