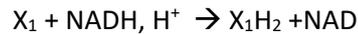


Une enzyme E catalyse la réduction d'un substrat X_1 selon la réaction suivante :



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 X_1 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 K_m de l'enzyme E pour le substrat X_1 est de 2 μM . La vitesse initiale mesurée dans la cuve est de 275 $\mu\text{mol/L/min}$. Le coefficient molaire d'absorbance du NADH à 340 nm est de 6300 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

- 1) Calculer l'absorbance du mélange avant l'ajout du substrat X_1 .

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

$$= 0.2 \times 50/30 + 2.5 \cdot 10^{-3} \times 1/15 \times 6300$$

$$= 0.333 + 1.05$$

2 points (1 pour chacune des

absorbances si calculée séparément)

$$= 1.383$$

1 points

- 2) 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 X_1 , soit 320 μL .

Concentration Catalytique_{ech} = Concentration Catlytique_{cuve} x Vol tot/vol ech

2 points

$$= 275 \times 320/10 = 8\,800 \text{ U/L}$$

2 points

- 3) Calculer la V_{max} dans la cuve.

V_o est de 275 $\mu\text{mol/L/min}$ pour $[X_1] = 160 \times 20/320 = 10 \mu\text{M}$ soit 5. K_m donc $V_m = 275 \times 6/5 = 330 \mu\text{mol/L/min}$

5 points

- 4) 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 X_1 donne les résultats suivants :

$V_{o_{inhib}}$ $\mu\text{mol/L/min}$	14	35	55	72	81	90	100	109	110
$[X_1]$ 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 V_{max} app est d'environ $110 \mu\text{mol/L/min}$ et K_m app environ $0.67 \mu\text{M}$ 3 points

Or $V_m = 330 \mu\text{mol/L/min}$ et $K_m = 2 \mu\text{M}$. K_m app et V_m 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 X_1 pour l'enzyme E 4 points

- 5) Comment évolue le pourcentage d'inhibition si l'on augmente la concentration en X_1 ?

Attention comment évolue ne demande pas de calculer exactement le % d'inhibition, une réponse qualitative est suffisante, si cela n'est pas demandé le calcul ne rapportera rien.
En cas d'inhibition incompétitive 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

- 6) La même enzyme E peut réagir avec un second substrat X_2 dans les mêmes conditions opératoires (mêmes volumes et même concentration en substrat), le K_m du couple (E, X_2) est de $8 \mu\text{M}$ et la K_{cat} est deux fois plus grande que celle du couple (E, X_1). Comparer l'efficacité enzymatique de l'enzyme E pour X_1 et X_2 .

Efficacité enzymatique = K_{cat}/K_m
2 points

pour X_1 Eff enz = $K_{cat_{X_1}}/2$
2 points

pour X_2 Eff enz = $2 \times K_{cat_{X_1}}/8 = K_{cat_{X_1}}/4$.
2 points

L'enzyme est donc deux fois plus efficace pour le substrat X_1 que pour le substrat X_2
2 points

- 7) Calculez dans les mêmes conditions opératoires la concentration catalytique (en U/L) dans la cuve pour $[X_2] = 0,04 \text{ mM}$

$[X_2] = 40 \mu\text{M} = 5 \cdot K_m$
2 points

La $K_{cat_{X_2}} = 2 \times K_{cat_{X_1}}$ donc $V_{max_{X_2}} = 2 \times V_{max_{X_1}}$
2 points

Si on applique l'équation de HMM :

$V_{o_{X_2}} = V_{m_{X_2}} \times 5/6 = 330 \times 2 \times 5/6 = 550 \mu\text{mol/L/min}$ donc $CC_{X_2 \text{ cuve}} = 550 \text{ U/L}$
4 points