

DFASP2 – PHBMR – 5^{ème} Année de Pharmacie 2024/2025

UE 93 – Exercices d'application 2^{ème} partie

Orientation Pharmacie Hospitalière, Biologie Médicale et Recherche

Enzymologie PHBMR

Exercices à préparer pour le

mardi 17 septembre 2024

10h-12h

Exercice 1

On désire étudier une α -glucosidase, enzyme hydrolysant spécifiquement les glucosides liés en 1 α . L'enzyme est dissoute en tampon, le substrat utilisé est le méthyl-1 α -glucose (méthylglucose) à 50 $\mu\text{moles.L}^{-1}$, et les produits formés sont le méthanol et le glucose.

Dans une première expérience, on mesure la concentration d'un des produits (P) formés en fonction du temps :

[P] en nmoles.L⁻¹	temps en secondes (s)
10	60
20	120
30	180
40	240
45	300
48	360

- **Écrire le schéma de la réaction catalysée par l'enzyme. Pourquoi le substrat est-il spécifique de l'enzyme ?**
- **Quelle est la durée (minimale) de la phase stationnaire ?**
- **Quelle est l'activité de cette α -glucosidase en U.L⁻¹ ? en mKat/L ?**

Dans une deuxième expérience, **sur une préparation purifiée de l'enzyme**, on détermine par la même méthode les v_0 en fonction de la concentration de substrat (S), et on obtient les résultats expérimentaux suivants :

[S] en $\mu\text{moles.L}^{-1}$	v_0 en $\text{nmoles.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$
1	16,7
2	28,6
5	50
10	66,7
40	88,9
50	90,9
100	95,2
200	97,6
250	99,4

- **Cette α -glucosidase est-elle une enzyme michaelienne ? Si oui, quelle est sa K_m pour le méthylglucose ?**
- **Pour une concentration en méthylglucose de $50 \mu\text{M}$, quelle proportion de la V_{max} est atteinte ? Quels sont les intérêts de se rapprocher le plus possible de la V_{max} ?**
- **Rappelez les conditions « idéales » pour déterminer une activité enzymatique.**

Exercice 2

Le diabète MODY-2 est dû à une anomalie de la glucokinase. Au laboratoire, nous entreprenons d'étudier l'activité de cette enzyme, obtenue à partir de cellules d'un sujet « sain » et d'un sujet malade, en faisant varier la concentration en substrat [S] (le substrat dans le cas présent est le glucose) et en mesurant la vitesse enzymatique initiale (V_0). Les mesures sont réalisées dans un volume réactionnel final de 1 ml. Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

[S] (mM)	0,5	1	1,5	2	3	4	8	16
Sujet sain V_0 (mM.mn ⁻¹)	0,45	0,75	0,9	1,2	1,7	2,1	2,4	2,4
Sujet malade V_0 (mM.min ⁻¹)	0,1	0,15	0,22	0,3	0,45	0,5	0,6	0,6

→ Déterminer la V_{max} , la K_m chez le sujet sain et chez le sujet malade.

→ Parmi les propositions suivantes indiquer la (les) bonne(s) réponse(s):

- A. L'affinité de la glucokinase du sujet malade pour le glucose est inférieure à celle du sujet sain.
- B. La vitesse maximale de la glucokinase du sujet malade est inférieure à celle du témoin.
- C. Lorsque l'enzyme du sujet malade est saturée, l'activité enzymatique est de 6 UI (unité enzymatique).
- D. Dans le cas de la glucokinase du sujet malade, le glucose est considéré comme un inhibiteur compétitif.
- E. La réaction catalysée par la glucokinase est réversible.

On désire étudier une préparation de lactate-déshydrogénase (LDH) en utilisant la réaction naturelle de transformation du pyruvate. Pour cela, on ajoute 50 μl de cette préparation à 0,95 ml d'une solution de pyruvate et de NADH,H^+ tamponnée à pH 7,4 ; après agitation, le mélange est placé dans une cuve de 1 cm ; l'absorbance est lue immédiatement à 340 nm dans un spectrophotomètre dont le zéro a été réglé sur l'air. Du fait de la concentration en NADH,H^+ utilisée, la réaction est rendue irréversible.

On obtient les résultats suivants :

Temps (en sec)	A340 nm
0	1,495
10	1,490
20	1,485
30	1,480
60	1,470
90	1,468
120	1,468

Rappel : loi de Beer Lambert $A = \epsilon.l.c$ avec A, absorbance (sans unité) ; ϵ , coefficient d'extinction molaire NADH,H^+ (340 nm) = $6,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}.\text{mole}^{-1}.\text{L}$ et l, longueur de la cuve en cm.

Questions :

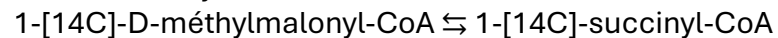
- 1- Rappelez le principe de la méthode pour déterminer l'activité LDH.
- 2- Calculez la quantité de pyruvate contenue au départ dans le milieu réactionnel.
- 3- Calculez la quantité de pyruvate transformée en 60 secondes.
- 4- Calculez l'activité de la LDH dans la préparation en l'exprimant en nkat.L^{-1} . Généralisez ce mode de calcul.

**Regarder éventuellement l'exercice suivant.
Si possible, nous en discuterons ensemble...**

Afin de mesurer l'activité de la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM) dans un lysat cellulaire purifié vous disposez de quatre réactifs, les volumes entre parenthèses correspondent aux volumes à utiliser pour réaliser la réaction :

- une solution de substrat marqué au ^{14}C de D-méthylmalonyl-CoA de concentration égale à 2 mM (400 μL)
- une solution contenant entre autre un tampon adapté à la mesure de la MCM (750 μL)
- une solution du coenzyme de la MCM (600 μL)
- un lysat cellulaire purifié dont la concentration en protéines totales est de 5 mg/L (250 μL).

La MCM catalyse la réaction suivante :



Le K_m de la MCM pour le D-méthylmalonyl-CoA est de 0.2 mM

Dans une première étape vous devez choisir les trois réactifs que vous allez mettre pendant 5 minutes dans un tube à essais à 37°C avant de déclencher la réaction avec le quatrième réactif. Votre choix doit garantir une plus grande spécificité de la réaction

1) Quels sont les trois réactifs que vous choisissez pour cette première étape, quel nom porte-t-elle et à quoi sert-elle ?

Une fois la réaction déclenchée, vous prélevez 200 μL de mélange réactionnel toutes les minutes que vous plongez immédiatement dans 800 μL d'acide perchlorique glacial.

2) A quoi sert l'acide perchlorique glacial ?

Le succinate radiomarqué formé est séparé du substrat n'ayant pas réagi et l'on compte la radioactivité associée au produit de la réaction. Voici les résultats obtenus :

Temps	cpm
1	3000
2	6000
3	9000
4	12000
5	14500
6	16900
7	17500
8	17600
9	17650
10	17650

- 3) Calculez l'activité enzymatique dans le lysat cellulaire que vous exprimerez en cpm/min/ μ g de protéine.
- 4) En déduire l'activité enzymatique que l'on aurait obtenue dans le lysat cellulaire dans les mêmes conditions si l'enzyme avait été saturée par son substrat.
- 5) La réaction est reproduite à l'identique (mêmes constituants, mêmes conditions opératoires) mais on ajoute une poudre en plus à la première étape (on considère le volume de la poudre P comme négligeable). En présence de la poudre contenant un composé P pur, il est déterminé, à partir d'une série de manipulations, une valeur du K_m de la MCM égale à X μ M et une V_{max} égale à Y cpm/min/ μ g. Que peut-on dire de P ? (justifier)
- 6) En déduire la concentration du composé constituant la poudre P en l'exprimant en fonction de la constante de dissociation P-MCM.
- 7) Comment évoluerait l'activité enzymatique si on doublait la quantité de substrat en présence de la même quantité de produit P. Expliquer