

ED d'enzymologie - 2^{ème} Année - UE4

2024-2025

Exercice n°1 :

On étudie une solution partiellement purifiée d'uréase contenant 12 mg/mL de protéines totales.

Question 1 :

Sachant que la formule de l'urée est $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, écrire la réaction catalysée par cette enzyme.

Question 2 :

On veut déterminer K_M et V_{\max} de cette enzyme sur **une dilution au 1/10^{ème} de la solution initiale.**

a) Indiquer le(s) paramètre(s) qui doit (doivent) varier et celui (ceux) qui doit (doivent) être préalablement défini(s) et maintenu(s) constant(s).

b) La vitesse est mesurée en conditions de vitesse initiale. Indiquer pourquoi et préciser comment la mesurer.

Question 3 :

La V_{\max} mesurée dans le milieu réactionnel sur la solution purifiée au 1/10^{ème} est de 96 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ de produit formé.

Par ailleurs, on constate que pour une concentration en urée dans le milieu réactionnel de 5,6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, la vitesse mesurée est de 76,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Calculez K_M et V_{\max} dans la solution purifiée.

Exercice n°2 :

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)	$A_{340 \text{ nm}}$
0	1,495
10	1,490
20	1,485
30	1,480
60	1,470
90	1,468
120	1,468

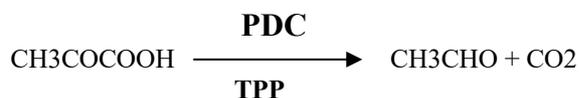
Rappel : loi de Beer Lambert $A = \epsilon.l.c$ avec A, absorbance (sans unité) ; ϵ , coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{\text{NADH,H}^+}$ (340 nm) = $6,3 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{L}$ et l, longueur de la cuve en cm.

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 $\text{nkcat} \cdot \text{L}^{-1}$. Généralisez ce mode de calcul.

Exercice n° 3 :

Chez la levure, la fermentation anaérobie entraîne la production de CO_2 et d'éthanol. Les 2 étapes terminales de cette voie métabolique sont les suivantes :



PDC : pyruvate décarboxylase

ADH : alcool déshydrogénase

TPP : thiamine pyrophosphate (dérivé de la vitamine B1)

L'alcool déshydrogénase est inhibée par l'acétone. Pour déterminer le mode d'action de cet inhibiteur, 2 expériences sont entreprises.

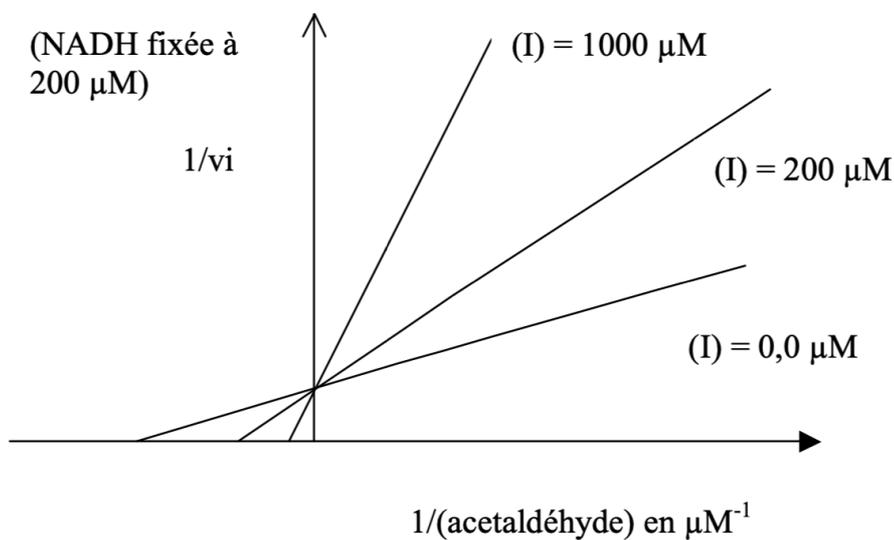
1°) Dans la 1^{ière} expérience la concentration en acétaldéhyde est fixée à $200 \mu\text{M}$ (en excès), la concentration en NADH est variable et on travaille avec ou sans inhibiteur (acétone) à concentration fixée.

NADH μM	vitesse initiale en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$		
	(I) = 0,0 μM	(I) = 200,0 μM	(I) = 1000,0 μM
2	11,1	10,3	8,1
4	20,7	18,2	12,2
12	48,6	36,7	18,6
20	66,7	46,2	20,7
25	75	50	21,4
40	92,3	57,1	22,6
50	100	60	23,1
100	120	66,7	24
500	142,9	73,2	24,8
2000	148,1	74,5	24,9
10000	149,6	74,9	25

Question 1 :

- a) Pourquoi se place t'on à une concentration fixée (et en excès) d'acétaldéhyde ?
- b) A partir des valeurs de ce tableau extrapolez (sans faire de graphique) les valeurs de K_M et V_{max} apparents (à l'égard du NADH, H^+) en absence et en présence d'inhibiteur (acétone).
- c) Quel est le mécanisme d'inhibition par l'acétone le plus probable ? Expliquez
- d) Déterminez le K_i par le calcul à partir des valeurs extrapolées du tableau (ou par une représentation secondaire).

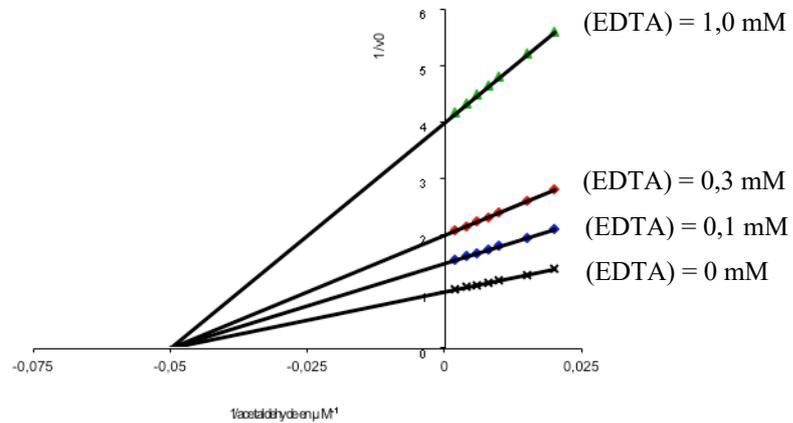
2°) Au cours d'une 2^{ième} expérience la concentration en NADH est fixée à $200\mu M$ (en excès), la concentration en acétaldéhyde est variable et on travaille avec les mêmes concentrations d'inhibiteur (acétone). Les résultats sont représentés en doubles inverses dans la figure ci-dessous :



Question 2 :

- a) Pourquoi se place t'on à une concentration fixée (et en excès) de NADH, H^+ ?
- b) Quel est le mécanisme d'inhibition le plus probable de l'acétone vis à vis de l'acétaldéhyde ?

3°) Le zinc (Zn^{2+}) est un métal indispensable à l'activité de l'ADH. L'EDTA est un agent chélatant de métaux bivalents et qui inhibe l'ADH. Au cours d'une 3^{ème} expérience la concentration en NADH est fixée à $200\mu M$, la concentration en acétaldéhyde est variable et on travaille sans ou avec une concentration fixée d'EDTA. Les résultats sont représentés en double inverse dans la figure ci-dessous :



Question 3 :

- Quel est le mécanisme d'inhibition par l'EDTA et pourquoi ?
- Quelle est l'étape (fixation ou catalyse ?) qui dans le mécanisme réactionnel requière du Zn^{2+} et pourquoi ?