

# COURS/ED

# Enzymologie

*Jeudi 07 novembre 2024*

*Quelques exercices et QCM à revoir / préparer...*

*arnaud.bruneel@universite-paris-saclay.fr*

## QCM1

On étudie une enzyme E à cinétique michaelienne. On mesure l'apparition du produit P en fonction du temps en présence d'une concentration fixe non saturante de S.

Temps	[P] en $\mu\text{mol/ml}$
0 min	0
1 min	2,5
5 min	12,5
10 min	25
20 min	37,5
30 min	50
60 min	52,5

À l'aide des données figurant dans le tableau ci-dessus, indiquez les items exacts :

		Vrai	Faux
A	On peut déduire une vitesse initiale		
B	On peut déduire ou calculer $K_m$		
C	On peut déduire ou calculer $V_{\text{max}}$		
D	Il est judicieux de faire une représentation en double inverse		

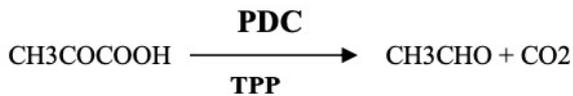
## QCM2

Pour une enzyme michaelienne :

		Vrai	Faux
A	Si $[S] = \frac{1}{2} K_m$ , alors $v = 0,5 V_{\text{max}}$		
B	Si $[S] = \frac{1}{2} K_m$ , alors $v = 0,33 V_{\text{max}}$		
C	Si $[S] = 20 K_m$ , alors $v = 95 \% V_{\text{max}}$		
D	Connaissant la $K_m$ et $k_2$ , on peut se servir d'une seule mesure de vitesse à $[S]$ fixée pour déterminer une concentration d'enzyme		
E	Connaissant précisément deux valeurs de $[S]$ et les vitesses correspondantes, on peut déterminer les valeurs de $K_m$ et $V_{\text{max}}$		

## Exercice 1 (idem ex3 de l'ED)

Chez la levure, la fermentation anaérobie entraîne la production de CO<sub>2</sub> 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.

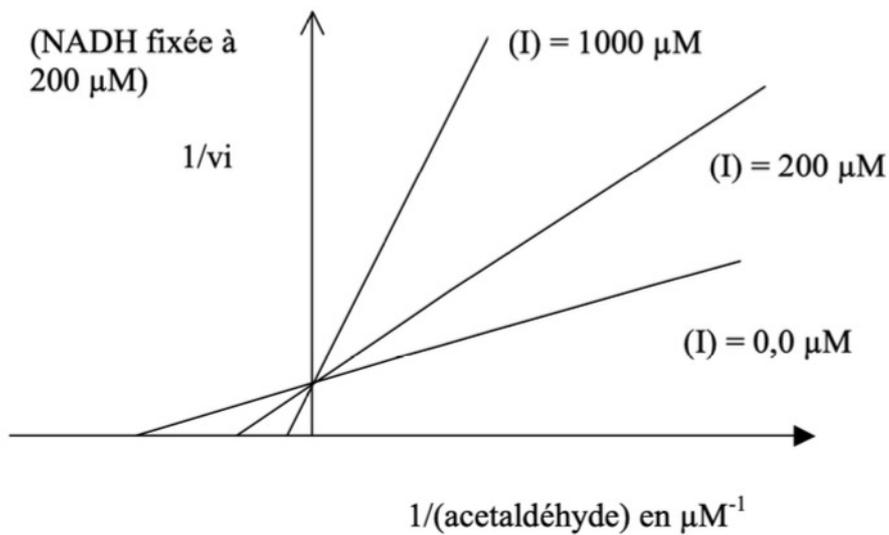
1<sup>o</sup>) Dans la 1<sup>ère</sup> expérience la concentration en acétaldéhyde est fixée à 200 μM (en excès), la concentration en NADH est variable et on travaille avec ou sans inhibiteur (acétone) à concentration fixée.

NADH μM	vitesse initiale en μmol/min/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 :

- Pourquoi se place t'on à une concentration fixée (et en excès) d'acétaldéhyde ?
- 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<sup>+</sup>) en absence et en présence d'inhibiteur (acétone).
- Quel est le mécanisme d'inhibition par l'acétone le plus probable ? Expliquez
- Déterminez le  $K_i$  par le calcul à partir des valeurs extrapolées du tableau (ou par une représentation secondaire).

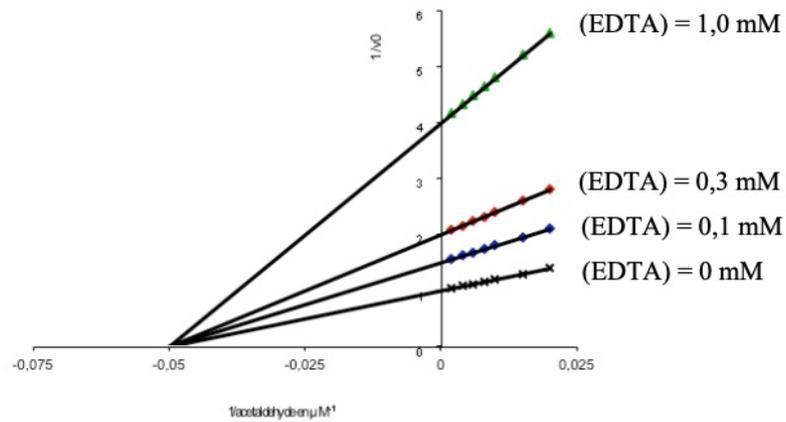
2°) Au cours d'une 2<sup>ème</sup> expérience la concentration en NADH est fixée à 200  $\mu\text{M}$  (en excès), la concentration en acétaldéhyde est variable et on travaille avec les mêmes concentrations d'inhibiteur (acétone). Les résultats sont représentés en doubles inverses dans la figure ci-dessous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



**Question 2 :**

- Pourquoi se place t'on à une concentration fixée (et en excès) de NADH,  $\text{H}^+$  ?
- 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<sup>ème</sup> 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 ?

### QCM3

**On désire étudier l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ; pour cela on l'a purifiée en 3 étapes à partir du poumon de bœuf :**

- **Étape 1** : broyage d'un échantillon de poumon en tampon isotonique pH 8, puis centrifugation avec recueil du surnageant dont on détermine l'activité ECA.
- **Étape 2** : fractionnement du surnageant par chromatographie d'échange d'ions (CEI) ; on recueille les fractions du gradient d'éluion de la CEI portant une activité ECA.
- **Étape 3** : fractionnement par chromatographie d'affinité sur un inhibiteur de l'ECA (IEC) des fractions recueillies de la CEI ; on recueille les fractions de l'éluion par compétition avec l'IEC libre ; on les dialyse pour éliminer l'IEC et déterminer l'activité ECA.

**Après cette étape, l'ECA est homogène en PAGE-SDS en montrant une seule bande correspondant à sa masse moléculaire. Pour juger de la qualité de la purification, on a déterminé l'activité ECA après chaque étape ; on a aussi dosé les protéines totales pour dresser un tableau de purification :**

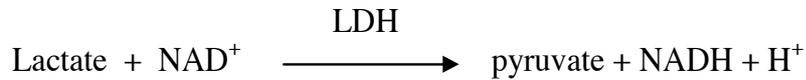
Étape	Activité ECA (UI/L)	Protéines totales (g/L)	Volume des fractions ECA (L)
1	800	2	1,0
2	20000	5	0,02
3	400000	20	0,001

**Questions :**

- 1- L'ECA est purifiée de 10 fois après l'étape 2.
- 2- L'ECA est purifié de 500 fois après l'étape 3.
- 3- L'activité spécifique de l'ECA est de 400 UI/g de protéines après l'étape 1.
- 4- Le rendement global de purification de l'ECA est de 50%.
- 5- On obtient 2 mg d'ECA purifiée.

## Exercice 2

On se propose de doser le lactate plasmatique par voie enzymatique selon les réactions suivantes :



Quatre  $\mu\text{L}$  de plasma sont introduits dans la cuve réactionnelle d'un analyseur puis successivement 200  $\mu\text{L}$  de réactif R1 à 10 sec, 50  $\mu\text{L}$  de réactif R2 à 1 min 30 ; 50  $\mu\text{L}$  de réactif R3 à 5 min. Une première lecture est effectuée à 340 nm à 5 min et une deuxième à 10 min. La variation d'absorbance lue entre 5 et 10 min est de 0,378.

- 1- S'agit-il d'un dosage en mode cinétique ou en point final ?
- 2- Sachant que dans les conditions standard à pH 7, l'équilibre est en faveur du lactate, commenter le rôle de l'ALAT et du tampon pH 10.
- 3- Sachant que le coefficient d'extinction molaire du  $\text{NADH}, \text{H}^+$  à 340 nm est de  $6,3 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{\text{+1}} \text{ cm}^{-1}$ , calculer la concentration en mmol/L du  $\text{NADH}, \text{H}^+$  libéré dans le milieu réactionnel.
- 4- En déduire la concentration du lactate plasmatique du malade.

R1	tampon carbonate pH 10 ; 0,5 M ; glutamate 63 mmol/L
R2	NAD 4,6 mmol/L
R3	LDH > 1632 U/mL ; ALAT > 102 U/mL