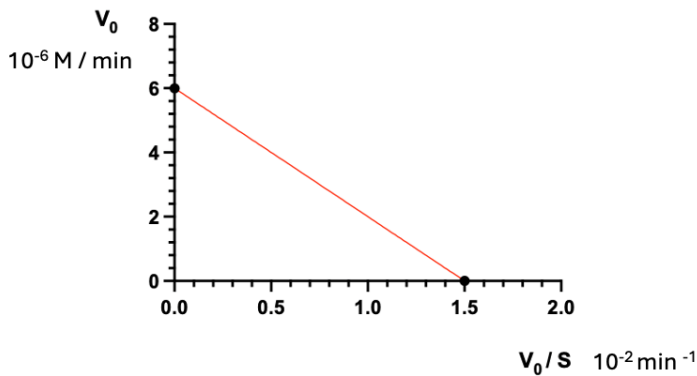


On considère une enzyme michaelienne E catalysant la transformation d'un substrat S en produit P.
 À l'aide d'une même solution de E et dans des conditions opératoires optimisées, on mesure les vitesses initiales V_0 obtenues pour différentes concentrations de S.

Question 1 : Pour le couple E-S, exprimez V_0 en fonction de V_0/S . Comment se nomme la représentation graphique correspondante ?

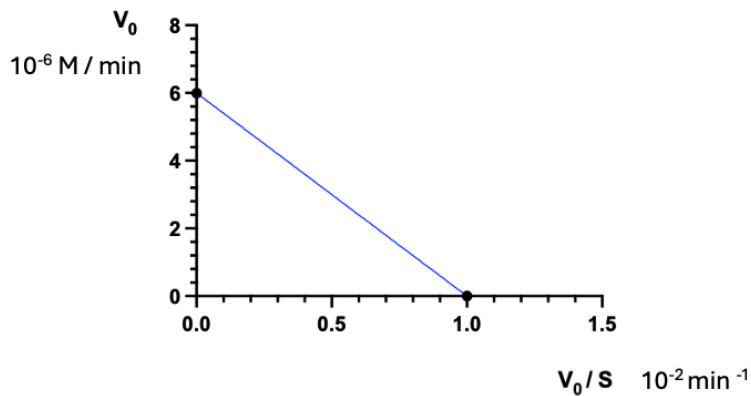
On obtient le graphe n°1 suivant :



Question 2 : Déterminez $V_{\max}$ et K_M

Question 3 : Déterminez (en milliKatal/L) la concentration catalytique (CC) de la solution enzymatique utilisée,
 - si on utilise une concentration saturante en substrat S
 - si on utilise une concentration en substrat S = 1,2 mM

L'étude précédente (graphe n°1) est répétée après avoir ajouté au milieu réactionnel une molécule M à la concentration finale de $2 \cdot 10^{-4}$ M. On obtient le graphe n°2 suivant :



Question 3 : Comment se comporte la molécule M vis-à-vis de la réaction enzymatique impliquant E et S ?
 Expliquez

Question 4 : Déterminez la constante de dissociation (K_i) de la molécule M

Question 5 : À partir de l'équation de Michaelis-Menten, exprimez $1/V$ en fonction de $1/S$. Comment se nomme la représentation graphique correspondante ?

Question 6 : En utilisant cette représentation ($1/V$ en fonction de $1/S$), schématisez sur le même graphe, les deux situations décrites précédemment (correspondant aux graphes n°1 et n°2).

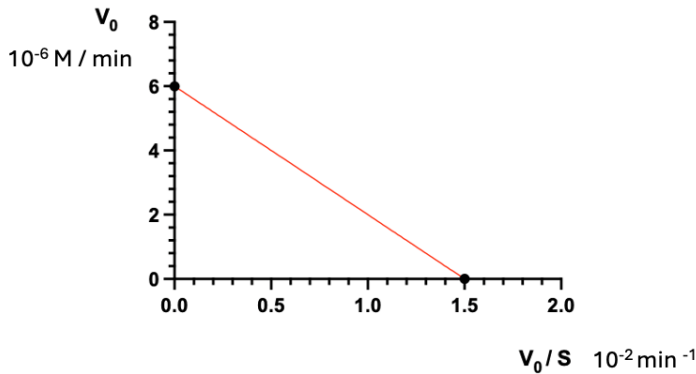
On considère une enzyme michaelienne E catalysant la transformation d'un substrat S en produit P.
À l'aide d'une même solution de E et dans des conditions opératoires optimisées, on mesure les vitesses initiales V_0 obtenues pour différentes concentrations de S.

Question 1 : Pour le couple E-S, exprimez V_0 en fonction de V_0/S . Comment se nomme la représentation graphique correspondante ?

$V_0 = -K_M \cdot (V_0/S) + V_{max}$ (2 points)

Représentation d'Eadie-Hofstee (ou à peu près ça) ; (1 point).

On obtient le graphe n°1 suivant :



$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S}$$

$V_0 \text{ est fn } \frac{V_0}{S}$

$$V_0 = \frac{\frac{V_{max} \cdot S}{S}}{\frac{K_M + S}{S}} = \frac{V_{max}}{\frac{K_M}{S} + 1}$$

$$\Rightarrow V_0 \frac{K_M}{S} + V_0 = V_{max}$$

$$\Rightarrow V_0 = -K_M \frac{V_0}{S} + V_{max}$$

Question 2 : Déterminez V_{max} et K_M

V_{max} = valeur correspondant à l'intersection axe des y = $6,0 \cdot 10^{-6}$ M/min (2 points – attention unités)

V_{max}/K_M = valeur correspondant à l'intersection axe des x = $0,015 \text{ min}^{-1}$ (1 point) $\rightarrow K_M = 6,0 \cdot 10^{-6} / 0,015 = 400 \mu\text{M}$ (2 points – attention unités).

Question 3 : Déterminez (en milliKatal/L) la concentration catalytique (CC) de la solution enzymatique utilisée,

- si on utilise une concentration saturante en substrat S

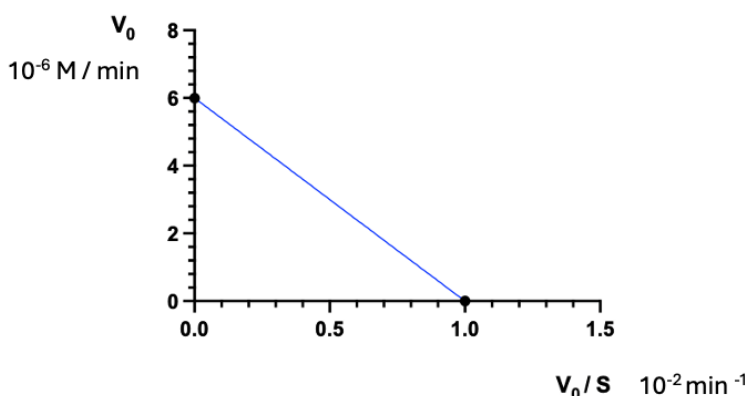
- si on utilise une concentration en substrat $S = 1,2 \text{ mM}$

1) Concentration saturante en substrat donc en V_{max} (1 point) = $6 \mu\text{moles par litre et par minute}$ (1 point).

Vitesse qui correspond à une CC = $6/60 = 0,1 \mu\text{Kat/L} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mKat/L}$ (2 points – attention unités).

2) $S = 1,2 \text{ mM} = 3 K_M$ (1 point) donc $V_0 = \frac{3}{4} V_{max} = 4,5 \mu\text{moles par litre et par minute}$ (2 points). Vitesse qui correspond à une CC = $4,5/60 = 0,075 \mu\text{Kat/L} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mKat/L}$ (2 points – attention unités).

L'étude précédente (graphe n°1) est répétée après avoir ajouté au milieu réactionnel une molécule M à la concentration finale de $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. On obtient le graphe n°2 suivant :



Question 3 : Comment se comporte la molécule M vis-à-vis de la réaction enzymatique impliquant E et S ?

Expliquez

Même V_{max} apparente (1 point) et K_M apparent = $600 \mu\text{M}$ (1 point) donc Inhibition compétitive (1 point)

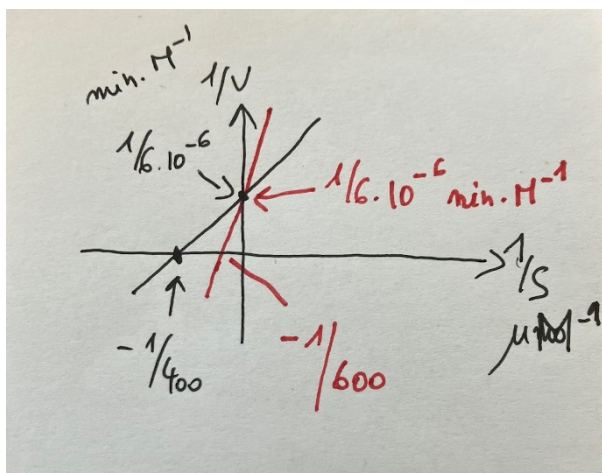
Question 4 : Déterminez la constante de dissociation (K_i) de la molécule M

IC donc $K_M \text{ apparent} = K_M (1 + I/K_i)$ donc $K_i = 2 \times 2 \cdot 10^{-4} \text{ M} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (3 points si bonne réponse avec bonnes unités)

Question 5 : À partir de l'équation de Michaelis-Menten, exprimez $1/V$ en fonction de $1/S$. Comment se nomme la représentation graphique correspondante ?

$1/V = (K_M/V_{max}) \times (1/S) + 1/V_{max}$ (2 points) ; double-inverse ou LB ou Lineweaver et Burke (1 point).

Question 6 : En utilisant cette représentation ($1/V$ en fonction de $1/S$), schématisez sur le même graphe, les deux situations décrites précédemment (correspondant aux graphes n°1 et n°2).



$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_m + S}{V_{max} \cdot S} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot S} + \frac{S}{V_{max} \cdot S}$$

$$= \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

4 points si tout y est.

TOTAL : sur 30 et X 4/3 → note sur 40

arnaud.bruneel@universite-paris-saclay.fr

arnaud.bruneel@aphp.fr