

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 3 (40 points)

Enoncé

Pour une enzyme E agissant sur un substrat S, l'unité internationale (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme pouvant transformer 1.10^{-6} mole de substrat par minute dans les conditions conventionnelles précisées.

Dans les applications usuelles de la technique, on se trouve dans des conditions de vitesse initiale et la concentration en substrat du milieu d'incubation dans les conditions conventionnelles est fixée à :

$$[S] = 10 K_M = 10.10^{-4} \text{ M.}$$

Questions

QUESTION N° 1 :

Pour réaliser une expérience, on dissout 5 U d'une préparation d'enzyme A dans une solution tampon convenable et on complète à 1000 mL (solution B).

- Quelle est la concentration catalytique de cette solution B ?
- Quelle est l'activité enzymatique (ou vitesse initiale) de la solution B ?
- Calculer la vitesse initiale de la solution B en condition saturante en substrat.

Proposition de réponse

a) Concentration catalytique de la solution B :

$$5 \text{ U/L}$$

b) Activité enzymatique ou v_0 de la solution B :

$$5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ou } 5.10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

c) Vitesse initiale en condition saturante = V_{max} :

v_0 en conditions conventionnelles = $V_{\text{max}} (S) / [K_m + (S)]$. En exprimant (S) en unités K_m : $(S) = n \cdot K_m$ avec $n = 10$

$$v_0 = V_{\text{max}} \cdot n / (n + 1)$$

$$V_{\text{max}} = v_0 \times (11 : 10) = 5,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ou } 5,5.10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

QUESTION N° 2 :

Sur cette solution d'enzyme B nous devons contrôler les effets sur l'activité enzymatique d'un **inhibiteur non compétitif** présent dans le milieu d'incubation à une concentration de $[I] = 5.10^{-5} \text{ M}$. Le K_i de l'enzyme pour l'inhibiteur est de 1.10^{-5} M .

- Donner la définition de K_i .
- Quel est l'effet prévisible de l'inhibiteur sur K_M et V_{max} ? Justifier votre réponse.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 3 (40 points)

c. Calculer la vitesse apparente (v_{0app}) prévisible dans les conditions conventionnelles.

Proposition de réponse

a)

$$K_i = \frac{(E)(I)}{(EI)}$$

K_i correspond à la constante de dissociation du complexe EI

b) Nous sommes en présence d'un inhibiteur non compétitif donc pas d'action sur K_M et V_{max} diminue d'un facteur $(1 + [I]/K_i)$.

c) Calcul de v_{0app} :

$$v_{0app} / v_0 = 1/[1 + (I)/K_i] \text{ avec } [1 + I/K_i] = 6$$

$$\Rightarrow v_{0app} = v_0 / 6 = 5/6 = 0,833 \cdot 10^{-6} \text{ moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\text{ou encore : } v_{0app} = V_{mapp} \cdot [S] / K_m + [S] \text{ et } V_{mapp} = V_{max} / (1 + [I]/K_i)$$

$$V_{mapp} = 0,9717 \cdot 10^{-6} \text{ moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$v_{0app} = 0,9717 \cdot 10^{-6} \cdot (10/11) = 0,833 \cdot 10^{-6} \text{ moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

QUESTION N° 3 :

a. Calculer le pourcentage d'inhibition pour $(S) = 10 K_M$.

b. Quelle est l'évolution prévisible de ce pourcentage d'inhibition quand on augmente la concentration en substrat du milieu d'incubation ?

Proposition de réponse

a)

$$\% \text{ inh} = [(v_0 - v_{0app}) / v_0] \cdot 100 = \left(\frac{I}{K_i + I} \right) \times 100 = \left(\frac{5}{6} \right) \times 100 = 83,3 \%$$

b) Le pourcentage d'inhibition reste constant, car dans l'inhibition non compétitive, le pourcentage d'inhibition dépend de la concentration en inhibiteur [I] et de K_i et pas de la concentration en substrat [S].