

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 3 (40 points)

Enoncé

On étudie une solution partiellement purifiée d'uréase (EC 3.5.1.5) contenant 12 mg.mL^{-1} de protéines totales.

Questions**QUESTION N° 1 :**

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

Proposition de réponse**QUESTION N° 2 :**

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

- Indiquer le(s) paramètre(s) qui doit (doivent) varier et celui (ceux) qui doit (doivent) être préalablement défini(s) et maintenu(s) constant(s).
- La vitesse est mesurée en conditions de vitesse initiale. Indiquer pourquoi et préciser comment la mesurer.

Proposition de réponse

- Pour déterminer K_m et V_{max} , il faut mesurer la vitesse initiale (V_0) de la réaction en présence de concentrations croissantes en substrat. Tous les autres paramètres (nature et concentration du tampon, pH, température, concentration en enzyme, concentrations en effecteurs, ...) doivent être définis et maintenus constants.
- La relation de Michaelis permettant de calculer K_m et V_{max} n'est vérifiée qu'en conditions de vitesse initiale (V_0). Elle est mesurée par la pente de la courbe $[\text{S}] = f(t)$ ou $[\text{P}] = f(t)$ lorsque t tend vers 0 (tangente à l'origine).

QUESTION N° 3 :

La V_{max} mesurée dans le milieu réactionnel sur la solution purifiée diluée au $1/10^{\text{ème}}$ est de $96 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de produit formé. Par ailleurs, on constate que pour une concentration en urée dans le milieu réactionnel de $5,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, la vitesse mesurée est de $76,8 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Calculez K_m et V_{max} de l'uréase dans la solution purifiée.

Proposition de réponse

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)**

$$V_0 / V_{\max} = [S] / K_m + [S] = a / (a + 1) \text{ lorsque } S \text{ est exprimée en unités } K_m : [S] = a \cdot K_m$$

On en déduit :

$$76,8 / 96 = 5,6 / (K_m + 5,6) = a / (a + 1) \rightarrow a = 4 \rightarrow K_m = 5,6 / 4 = 1,4 \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$V_{\max} \text{ de la solution purifiée} = 960 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

QUESTION N° 4 :

Déterminer la pureté (en %) de la préparation purifiée, sachant que la masse moléculaire de l'uréase est de 224 kDa et que $k_{\text{kat}} = 240\,000 \text{ min}^{-1}$

Proposition de réponse

$$(E_t) = 96 \cdot 10^{-6} / 240\,000 = 400 \cdot 10^{-12} \text{ mol.mL}^{-1}$$

$$400 \cdot 10^{-12} \times 224\,000 = 89,6 \text{ } \mu\text{g d'enzyme.mL}^{-1}$$

$$89,6 \text{ } \mu\text{g d'enzyme/mL pour } 1,2 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ de protéines}$$

$$\rightarrow \text{pureté} = 7,4 \%$$