

Enzymologie : Calculs

Formules

$V_i = k_2 [E_i]$ (en phase stationnaire)

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

Présence d'un inhibiteur compétitif : $K'_m = K_m (1 + [I]/K_i)$

Présence d'un inhibiteur non compétitif : $V'_m = V_m / (1 + [I]/K_i)$

UI = μmol substrat/min

Katal = mol substrat/sec

AMS = mol substrat / (mol d'enz x sec) = k_2

AS = AE / prot (mg)

Facteur de purification = AS_i/AS_j

→ attention aux unités !!!

→ attention aux dilutions !!! $AE_f = AE_i \times V_i/V_f$ (V_i/V_f = facteur de dilution ex : dilution 1/50)

le plus souvent on veut retrouver l'AE initiale, après avoir fait les mesures sur la solution diluée :

$AE_i = AE_f \times V_f/V_i$ ex : pour la dilution au 1/50^e : $AE_i = AE_f \times 50$

Résolution de QCM

→ *Activité enzymatique*

- On constate après incubation de 30 minutes, en présence de 0,5 ml d'un sérum dilué 100 fois, une hydrolyse de 150 nmol de paranitrophénylphosphate, substrat de la phosphatase alcaline. L'activité phosphatase alcaline du sérum, exprimée en UI/L de sérum sera :

$$AE = \frac{150 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol} \times 100 \text{ (dilution !)}}{0,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} \times 30 \text{ min}} = 1000 \text{ UI/L}$$

- L'activité d'une enzyme du sérum est de 3500 UI/L. Quelle est, après 30 minutes d'incubation, la quantité de substrat transformé par 0,5 ml de ce sérum dilué au cinquième ?

$$3500 \text{ UI/L} = \frac{q \mu\text{mol} \times 50 \text{ (dilution !)}}{30 \text{ min} \times 0,0005 \text{ L}}$$

$$q = \frac{3500 \times 30 \times 0,0005}{50} = 1,05 \mu\text{mol} = 1050 \text{ nmol}$$

- Le dosage de l'activité alanine aminotransférase du sérum d'un patient donne comme résultat à 37°C, 500 UI/L de sérum. Quel est à 37°C, le temps d'incubation nécessaire pour que 2,5 mL de sérum du patient transforme 1,35 mg d'alanine ? poids moléculaire de l'alanine : 90

$$500 \text{ UI/L} = \frac{(1,35 \times 10^3 / 90) \mu\text{mol}}{t \text{ min} \times 2,5 \times 10^{-3} \text{ L}}$$

$$t = \frac{(1,35 \times 10^3 / 90)}{500 \times 2,5 \times 10^{-3}} = 12 \text{ min}$$

→ *Activité moléculaire spécifique*

- 40 µg d'une enzyme purifiée de poids moléculaire 20 000 daltons, transforment 24 µmoles de substrat par minute. Son activité moléculaire spécifique est de :

$$AMS = \frac{24 \times 10^{-6} \text{ mol}}{(40 \times 10^{-6} / 20000) \text{ mol} \times 60 \text{ sec}} = 200 \text{ s}^{-1}$$

→ *AMS, Km, Vm*

- L'activité moléculaire spécifique d'une enzyme est de $45 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$. 1 litre de milieu réactionnel contient 10^{-6} moles d'enzyme. Pour une concentration en substrat de 1mM, la vitesse de réaction est de 30 mmoles de substrat transformé par seconde. La valeur de Km est :

$$k_2 = AMS = 45 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$$

$$V_m = k_2 [Et] = 45 \cdot 10^3 \times 10^{-6} = 4,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/s}$$

$$K_m = (V_m [S] / V) - [S] = (4,5 \cdot 10^{-2} \times 10^{-3} / (30 \cdot 10^{-3})) - 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M} = 0,5 \text{ mM}$$

- Les vitesses sont exprimées en UI par millilitre de milieu d'incubation. La concentration de l'enzyme est de 10^{-6} M. A partir des données du tableau, calculez l'activité moléculaire de l'enzyme exprimée en seconde⁻¹.

S (mM)	V
0,4	3,6
0,5	4
1	5,3
2	6,4

$$AMS = k_2 = V_m / [Et]$$

On cherche Vm en se servant de la représentation à double inverse : $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$

1/S (mM ⁻¹)	1/V
2,5	0,28
2	0,25
1	0,19
0,5	0,16

Coefficient directeur = $(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$: $K_m / V_m = (0,28 - 0,16) / (2,5 - 0,5) = 0,06$
 1/Vm est l'ordonnée à l'origine : $0,06 = (1/V_m - 0,25) / (0 - 2)$; $1/V_m = 0,13$; $V_m = 7,7 \text{ UI/ml}$
 attention aux unités : $V_m = 7,7 \times 10^{-6} / (60 \times 10^{-3}) = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol / seconde / L}$
 $AMS = 1,3 \cdot 10^{-4} / 10^{-6} = 130 \text{ s}^{-1}$

→ *AS, facteur de purification*

- On se propose de purifier une enzyme. Pour cela, on détermine l'activité enzymatique et la concentration en protéine avant et après l'étape de purification.

	Avant purification	Après purification
Concentration en prot (mg/mL)	5	0,2
Activité enzymatique	1 mL de la solution diluée au 1/100 ^e transforme dans les conditions du dosage 250 µmol de substrat en 25 min	20 UI/µl

$$AS_i = \frac{250 \mu\text{mol} \times 100 (\text{dilution}) / (25 \text{ min} \times 10^{-3} \text{ L})}{5 / 10^{-3} \text{ mg/L}} = 200$$

$$AS_f = \frac{20 / 10^{-6} \text{ UI/L}}{0,2 / 10^{-3} \text{ mg/L}} = 100\ 000$$

$$\text{facteur de purification} = AS_f / AS_i = 10000 / 200 = 500$$

→ Equation de Michaelis et Menten

- La vitesse initiale d'une réaction enzymatique est égale à 25 % de la Vmax lorsque la concentration du substrat est de 4 mM. Quelle est la valeur de Km ?

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad \frac{V}{V_m} = 25\% = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{[S]}{0,25} - [S] = 1,2 \cdot 10^{-2} \text{ M} = 12 \text{ mM}$$

- Quel est le rapport [S] / Km lorsque la vitesse d'une réaction enzymatique (de type michaelien) est égale à 75 % de Vmax ?

$$\frac{V}{V_m} = 75\% = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad 1/0,75 = K_m/[S] + 1 \quad K_m/[S] = 0,33 \quad [S]/K_m = 3$$

- Chez la mère, à la naissance de son enfant, la valeur de Km pour le glucose de la lactose synthase est modifié en passant de 1200 mM à 1 mM. Sachant que la concentration de glucose disponible est de 5 mM, quel est le facteur de modification à la naissance, de la vitesse de synthèse du lactose par cette enzyme ?

$$V_1 = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m \times 5 \cdot 10^{-3}}{1200 \cdot 10^{-3} + 5 \cdot 10^{-3}} = 4,15 \cdot 10^{-3} \times V_m$$

$$V_2 = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m \times 5 \cdot 10^{-3}}{10^{-3} + 5 \cdot 10^{-3}} = 8,33 \cdot 10^{-1} \times V_m \quad \frac{V_2}{V_1} = \frac{0,833 V_m}{0,00415 V_m} = 200$$

→ Inhibiteurs

- Une enzyme est mise en présence d'un inhibiteur compétitif dans les conditions suivantes : La concentration du substrat et la valeur du Km sont égales à 10 mM. La concentration de l'inhibiteur et la valeur du Ki sont égales à 10 mM. Quel est le pourcentage de la vitesse de la réaction enzymatique en présence de l'inhibiteur ?

$$V_1 = \frac{V_m \times 10 \cdot 10^{-3}}{10 \cdot 10^{-3} + 10 \cdot 10^{-3}} = 0,5 V_m$$

$$V_2 = \frac{V_m \times 10 \cdot 10^{-3}}{2 \cdot 10^{-2} + 10 \cdot 10^{-3}} = 0,33 V_m \quad \text{car } K'_m = K_m (1 + [I]/K_i) = 10 \cdot 10^{-3} (1 + (10 \cdot 10^{-3} / (10 \cdot 10^{-3})) = 2 \cdot 10^{-2}$$

$$V_2 / V_1 = 0,33/0,5 = 0,667 \rightarrow 66,7 \%$$

- On étudie la vitesse initiale d'hydrolyse d'un substrat S par une enzyme en présence et en absence d'une substance X. Les résultats obtenus sont précisés dans le tableau suivant :

S en mM	V en absence de X	V en présence de X = 1mM
1	0,40	0,20
2	0,58	0,29
4	0,74	0,36

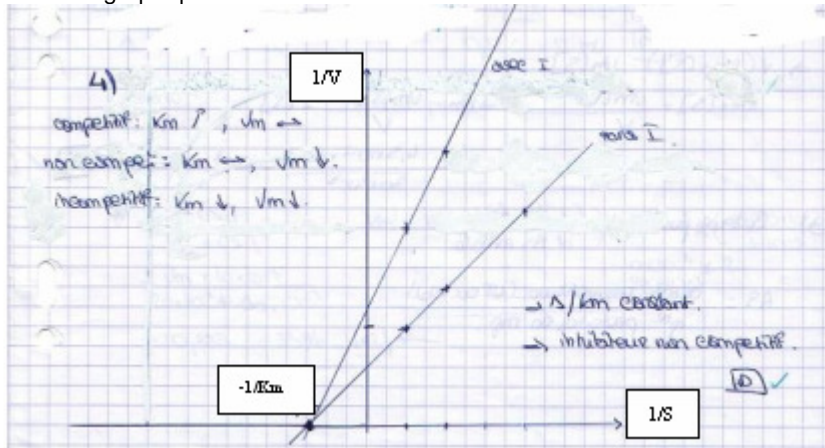
Les vitesses sont exprimées en µmoles de S transformé /min/mg d'enzymes.

Quel type d'inhibition exerce X ? Calculer Ki.

On s'intéresse à la représentation en double inverse, basée sur la formule en inverse de l'équation de Michaelis :

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

Méthode graphique :



Méthode calculatoire :

On calcule les inverses des valeurs données

1/S	1/V sans X	1/V avec X
1	2,5	5
0,5	1,72	3,45
0,25	1,35	2,78

Le coefficient directeur de la droite est égal à K_m/V_m . Coeff dir = $(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$

Sans X : $K_m/V_m = (2,5 - 1,35) / (1 - 0,25) = 1,53$

$1/V_m$ est l'ordonnée à l'origine : $1,53 = (1/V_m - 2,5) / (0 - 1)$ $1/V_m = 0,97$ $V_m = 1$

on en déduit $K_m = 1,53$

Avec X : $K'_m/V'_m = (5 - 2,78) / (1 - 0,25) = 3$

$1/V'_m$ est l'ordonnée à l'origine : $3 = (1/V'_m - 5) / (0 - 1)$ $1/V'_m = 2$ $V'_m = 0,5$

on en déduit $K'_m = 3 \times 0,5 = 1,5$

On voit qu'avec l'inhibiteur, V_m diminue mais K_m reste constant, il s'agit donc d'une inhibition non compétitive.

Calcul de K_i : $V'_m = V_m / (1 + [I]/K_i)$ $[I]/K_i = V_m/V'_m - 1 = 1$ donc $K_i = [I] = 1 \text{ mM}$