

EXERCICE

Une enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse : $A + H_2O \rightarrow C + D$

Les résultats de la cinétique (formation du produit C en fonction du temps) obtenus pour différentes concentrations en substrat A et pour une même concentration en enzyme sont reportés dans le tableau suivant :

Temps (min)	Concentration de A			
	10mM	30mM	100mM	150mM
0	0	0	0	0
2,5	1	2	3	3,5
5	2	4	6	6,5
10	3,5	7	11	12,5
15	5	9	16	18
20	6	10	19	22

- 1) Déterminez les vitesses initiales
- 2) Déterminez les paramètres cinétiques de l'enzyme (V_{max} et K_m).
- 3) Calculez la constante catalytique sachant que l'enzyme a été utilisée à une concentration de 1 mM. • Quelles données manque t'il pour exprimer l'activité spécifique de l'enzyme ?

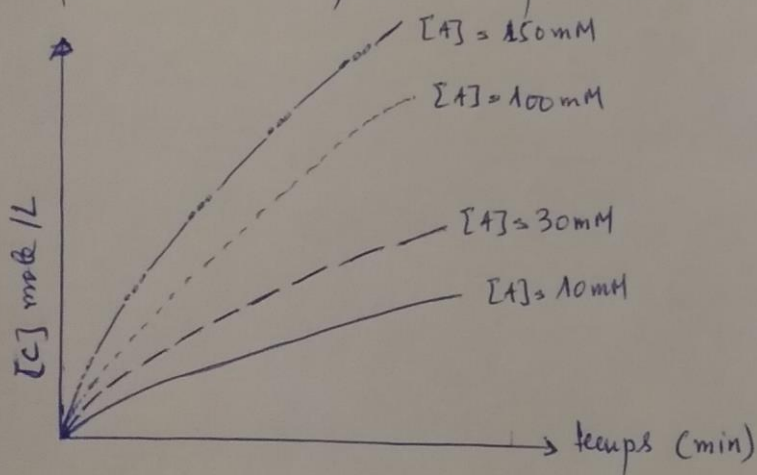
Correction

①

* Détermination de la vitesse initiale :

* D'après les courbes de l'apparition du produit C en fonction du temps, on peut déterminer les vitesses initiales pour différentes concentrations de du substrat A (tableau).

* pendant la période initiale de la réaction enzymatique qui dure quelques seconde à quelques minutes, la vitesse apparaît quasi constante, c'est ce qui correspond à la vitesse initiale, dans cette phase initiale, la courbe $[P] f(t)$ est une droite à partir de laquelle on peut déterminer la vitesse initiale



* calcul de la vitesse initiale à $[A] = 10 \text{ mM}$.

$$v_i = \frac{dP}{dt} \Rightarrow v_i = \frac{1-0}{2,5-0} \Rightarrow \boxed{v_i = 0,4 \text{ mole/min}}$$

* avec le même raisonnement pour les autres $[A]$, on aura les v_i exprimé dans le tableau suivant :

$[A] \text{ mM}$	10	30	100	150
$v_i \text{ mole/min}$	0,4	0,8	1,25	1,3

* Détermination des paramètres Cinétique de l'enzyme ②

- * les deux paramètres qui caractérisent les enzymes sont :
 - la vitesse maximale (V_{max})
 - la constante de Michaelis-Menten (K_m)

* pour les enzymes michaelienne on a : $v_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$

* puisque la saturation n'est pas atteinte, donc on peut pas utiliser cette équation pour déterminer V_{max} et K_m .

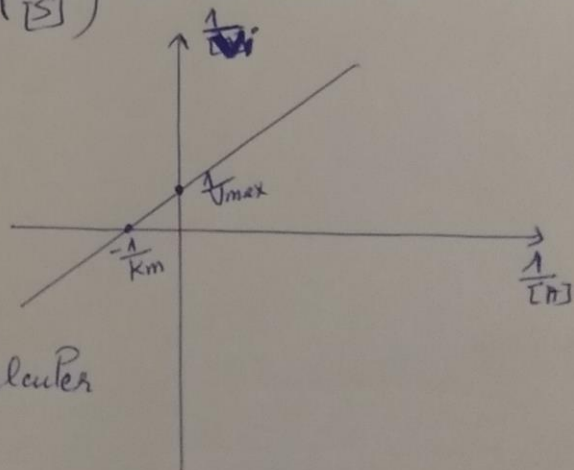
* on doit alors utiliser la linéarisation de l'équation précédente qui s'appelle équation de Lineweaver-Burk (les doubles inverse)

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

$$y = a x + b \text{ (droite)} : y \text{ f}(x) \text{ est une droite}$$

donc si on exprime $\frac{1}{v_i} \text{ f} \left(\frac{1}{[S]} \right)$ on va avoir une droite.

$[A] \text{ mM}$	10	30	100	150
$V_i \text{ mM/min}$	0,4	0,8	1,25	1,3
$\frac{1}{[A]}$	0,1	0,033	0,01	0,0066
$\frac{1}{v_i}$	2,5	1,25	0,8	0,769



* d'après la droite, on peut calculer V_{max} et K_m

$$V_{max} = 1,65 \text{ mM/min}$$

$K_m = ??$ à calculer

(3)

Calcul de la constante catalytique (k_{cat})

$$V_{max} = k_{cat} [E]_T \quad | [E]_T = \text{concentration de l'enzyme totale}$$

$$\Rightarrow k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T} = \frac{1,65 \text{ M/min}}{1 \text{ M} \times 10^{-3}}$$

$$k_{cat} = 1,65 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$$

k_{cat} : c'est le Nombre de molécule de substrat converties en produit par unité de temps par chaque site actif de l'enzyme quand l'enzyme est saturée.



$\frac{1}{k_{cat}}$: représente le temps requis pour transformer 01 molécule de substrat en produit.

* pour exprimer l'activité spécifique de l'enzyme, il faut avoir la quantité en protéine (enzyme) en mg
 $\Rightarrow$ donc il faut avoir la OM de l'enzyme.