Exercice

L'aspartate transcarbamylase d'*E. coli* est une enzyme oligomérique qui catalyse la réaction suivante :

Carbamyl phosphate + L. aspartate ⟶ carbamyl-aspartate + Pi

Les vitesses initiales de la carbamylation de l'aspartate (30°C, pH 8.4) pour différentes concentrations d'aspartate en absence et en présence de CTP, d'ATP et de chloromercuribenzoate (CMB) sont représentées dans le tableau suivant :

	Vitesses initiales			
Asp (M)		[CTP]=25mM	[ATP]=4mM	[CMB]=10mM
$2.\ 10^{-4}$	2	1	3	14
$5.\ 10^{-4}$	6	2	9	38
$10.\ 10^{-4}$	11	5	17	55
$15.\ 10^{-4}$	16	7	27	75
$25.\ 10^{-4}$	27	13	50	105
$50.\ 10^{-4}$	59	28	126	156
$70.\ 10^{-4}$	100	47	170	188
$90.\ 10^{-4}$	148	83	194	208
$120.\ 10^{-4}$	188	148	216	222
$150.\ 10^{-4}$	212	185	228	232

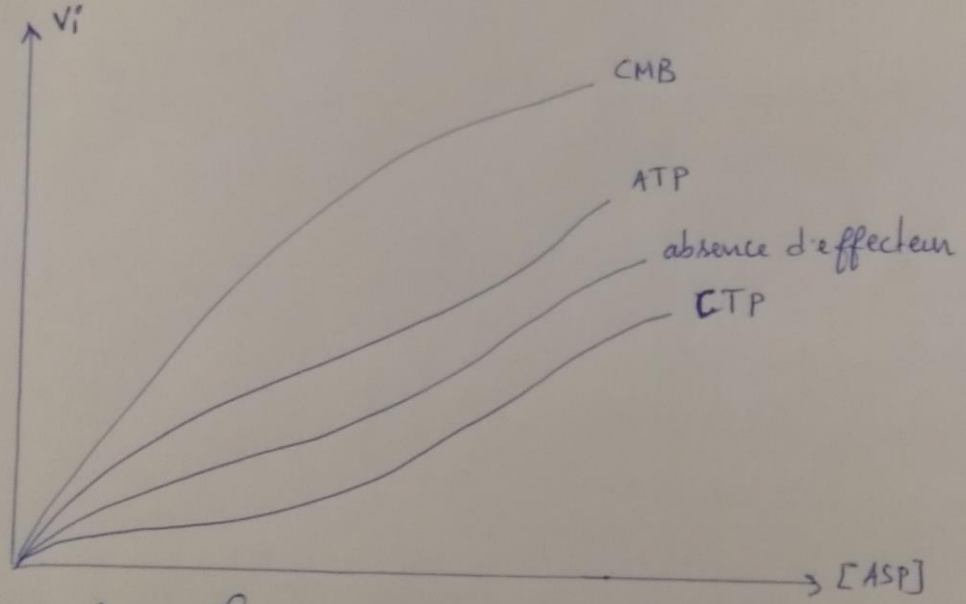
1) Interprétez les résultats obtenus.
2) Déterminez le nombre de Hill correspondant à chacune des expériences. Que conclure ?
3) Comment calculer Km pour chacune des expériences ?

Correction :

Carbamyl phosphate + L-aspartate $\xrightarrow[\text{transcarbamylase}]{\text{aspartate}}$ carbamyl aspartate + Pi

l'aspartate transcarbamylase est une enzyme de régulation de la synthèse des bases pyrimidique (CTP, TTP, UTP)
(ATP, GTP → bases puriques)

pour interpréter les résultats obtenus pour l'aspartate transcarbamylase, on trace la courbe Vi f [ASP] en presence et en absence d'effecteur.



d'après le graphe, on remarque que la courbe est sigmoïde en absence d'effecteur et en presence de CTP et d'ATP ⇒ donc la cinétique est allosterique { ATP = effecteur activateur / CTP = effecteur inhibiteur

En présence de CMB, la courbe est une hyperbole ⇒ la cinétique est michaélienne ⇒ le CMB est un agent desensibilisant, il provoque la perte de cooperativité entre les sous unité de l'enzyme.

* Celle réaction catalysé par l'aspartate trans carbamylase est la première d'une voie qui aboutit à la synthèse des nucléotides pyrimidique (C, T et U).

* On déduit que l'activité de la trans carbamylase est modulée par des signaux chimiques qui permettent d'ajuster son activité en fonction de la demande Cellulaire.

* Un excès de CTP ici prévient l'enzyme qu'il faut pas fonctionner à plein régime afin d'éviter la surproduction de nucléotides pyrimidique (le CTP ici exerce une rétro inhibition = feed back négatif)

* Par contre, un excès d'ATP indique que les bases puriques sont dominantes par rapport aux bases pyrimidiques (les bases puriques et pyrimidiques sont fabriquées par des voies différentes) => la cellule doit équilibrer le flux de production des nucléotides => l'ATP indique que la fabrication des purines a pris une avance sur la fabrication des pyrimidines et qu'il convient d'accélérer le fonctionnement de l'aspartate trans carbamylase (le CTP et l'ATP joue respectivement le rôle d'un frein et d'accélérateur de l'activité de l'enzyme).

2) Détermination du nombre de Hill n

pour les enzymes allostérique on a $V_i = \frac{V_{max}[S]^n}{K_m + [S]^n}$ équation de Hill

on va d'abord linéariser cette équation :

$$V_i = \frac{V_{max}[S]^n}{K_m + [S]^n} \Rightarrow V_i K_m + V_i [S]^n = V_{max}[S]^n$$

$$\Rightarrow V_i K_m = (V_{max} - V_i)[S]^n$$

$$\Rightarrow \frac{V_i}{V_{max} - V_i} = \frac{[S]^n}{K_m}$$

$$\Rightarrow \text{Log}\left(\frac{V_i}{V_{max} - V_i}\right) = \text{Log}\left(\frac{[S]^n}{K_m}\right)$$

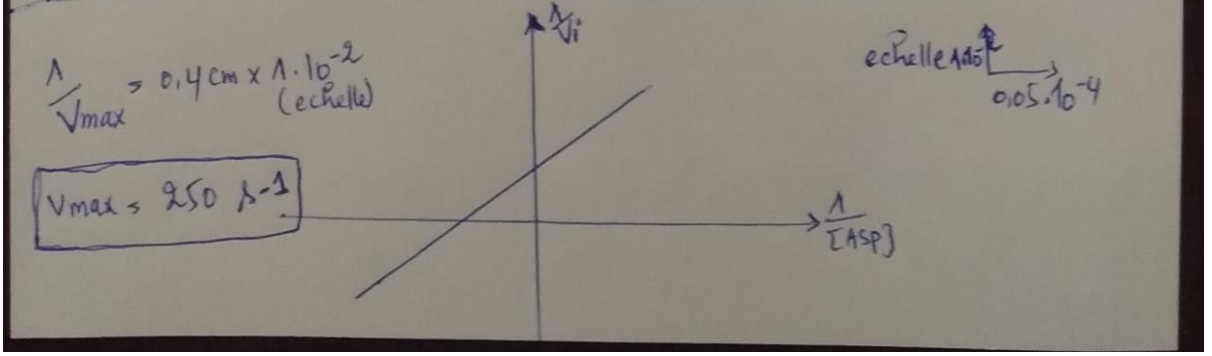
$$\Rightarrow \text{Log}\left(\frac{V_i}{V_{max} - V_i}\right) = n \log[S] - \log K_m$$

$$Y = aX + b$$

donc si on dessine $\text{Log}\left(\frac{V_i}{V_{max} - V_i}\right)$ f $\text{Log}[S]$ $\Rightarrow$ on va avoir une droite

• Il faut d'abord chercher V_{max}, car on l'a pas, on va le déterminer à partir de la cinétique en présence de CMB, car c'est une cinétique michaelienne, donc, on va tracer $\frac{1}{V_i}$ f $\left(\frac{1}{[ASP]}\right)$

$\frac{1}{[ASP]} \cdot 10^{-4}$	0,5	0,2	0,1	0,066	0,04	0,02	0,01	0,0083	0,0066
$\frac{1}{V_i} \cdot 10^{-2}$	7	2,6	1,8	1,33	0,95	0,53	0,48	0,45	0,43



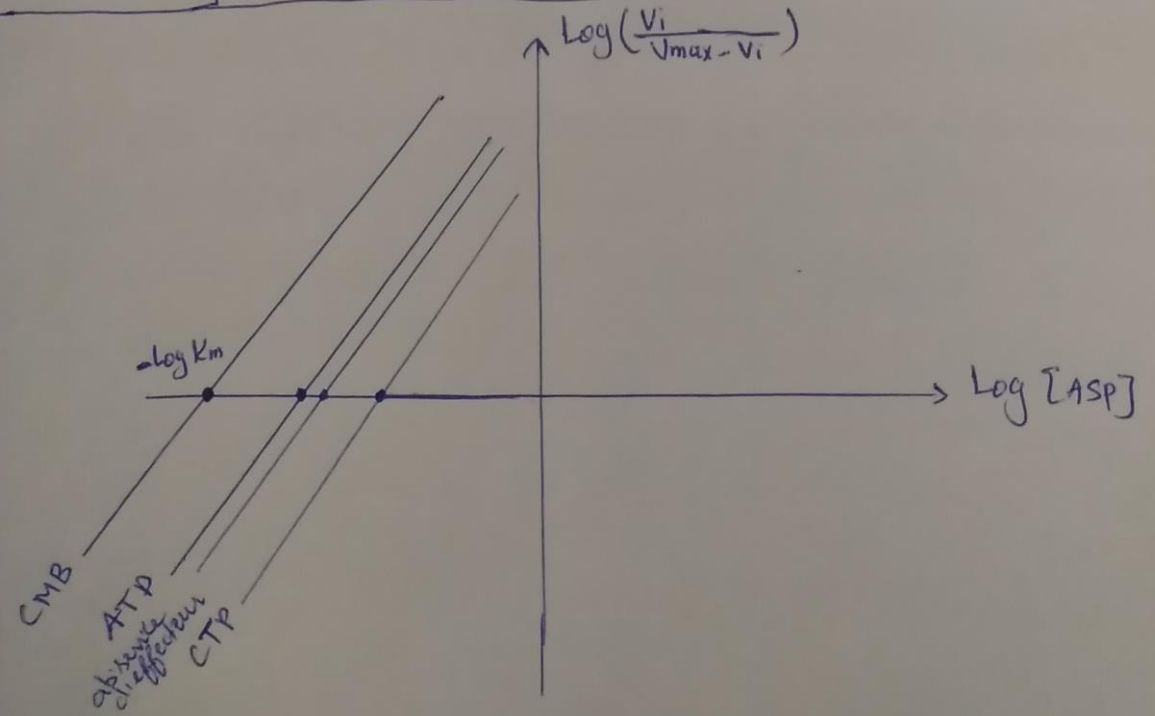
$\frac{1}{V_{max}} = 0,4\,cm \times 1 \cdot 10^{-2}$ (échelle)

$V_{max} = 250\ s^{-1}$

* Une fois qu'on a calculé Vmax, on peut dessiner

$$\text{Log}\left(\frac{V_i}{V_{max}-V_i}\right) \text{ f Log [ASP]}$$

Log [ASP]	Log $\frac{V_i}{V_{max}-V_i}$ absence d'effecteur	Log $\frac{V_i}{V_{max}-V_i}$ CTP	Log $\frac{V_i}{V_{max}-V_i}$ ATP	Log $\frac{V_i}{V_{max}-V_i}$ CMB
- 3,69	-2,09	- 2,39	-1,91	- 1,23
- 3,3	- 1,60	- 2,09	- 1,42	- 0,74
- 3	- 1,33	- 1,69	- 1,13	- 0,54
- 2,82	- 1,16	- 1,54	- 0,91	- 0,36
- 2,6	- 0,91	- 1,26	- 0,6	- 0,14
- 2,3	- 0,51	- 0,89	+ 0,0069	+ 0,22
- 2,15	- 0,17	- 0,63	+ 0,32	+ 0,48
- 2,04	+ 0,16	- 0,3	+ 0,53	+ 0,69
- 1,92	+ 0,48	+ 0,16	+ 0,8	+ 0,89
- 1,82	+ 0,74	+ 0,45	+ 1,01	+ 1,1



pour calculez le nombre de Hill n pour chaque experience, on va calculez la pente (tgα) de chaque droite

absence d'effecteur

$$n_1 = \frac{-0,91 + 2,09}{-2,60 + 3,69}$$

$\boxed{n_1 = 1,08}$ ⇒ cooperativité positive.

présence de CTP

$$n_2 = \frac{-0,89 + 2,39}{-2,30 + 3,69}$$

$\boxed{n_2 = 1,07}$ ⇒ cooperativité positive.

présence d'ATP

$$n_3 = \frac{-0,91 + 1,42}{-2,82 + 3,3}$$

$\boxed{n_3 = 1,06}$ ⇒ cooperativité positive.

présence de CMB

$$n_4 = \frac{-0,54 + 1,23}{-3 + 3,69}$$

$\boxed{n_4 = 1}$ ⇒ cooperativité nulle, cinétique michaelienne

3) On peut déduire la valeur de Km, en calculant le point de rencontre entre chaque courbe et l'axe des abssice, ce point correspond á - Log Km (graphe)