

*Université de Bejaia*

*Faculté des Sciences e la Nature et de la Vie*

*Département de Biologie Physico-Chimique*

**3<sup>ème</sup> année L.M.D. Biochimie**

**Exercice N°1 :**

A pH 7.7 et 25 °C, les cinétiques d'hydrolyse de l'O-nitrophényl galactoside par la  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* ont été étudié en absence ou en présence de l'un des inhibiteur suivant : O-nitrophényl  $\beta$ -D-thiogalactoside (ONPTG), maltose et mélibiose.

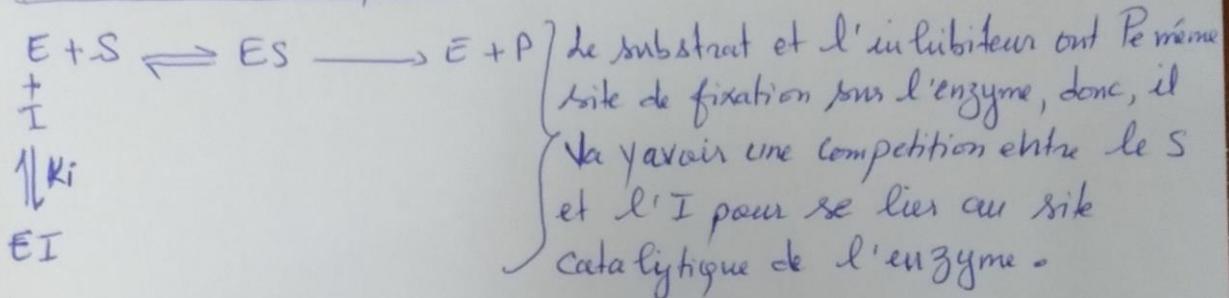
Les mesures de vitesse initiales pour chacune des expériences sont données dans le tableau suivant comme la variation de l'absorbance à 410nm par minute

[S <sub>0</sub> ] M	V <sub>0</sub> en absence d'inhibiteur	V <sub>0</sub> (ONPTG) 3 10 <sup>-4</sup> M	V <sub>0</sub> (maltose) 0.25 M	V <sub>0</sub> (mélibiose) 0.17 M
2.5 10 <sup>-5</sup>	0.033	0.018	0.0165	0.027
5 10 <sup>-5</sup>	0.055	0.033	0.0275	0.041
1 10 <sup>-4</sup>	0.0825	0.055	0.041	0.055
2.5 10 <sup>-4</sup>	0.118	0.091	0.059	0.069
5 10 <sup>-4</sup>	0.138	0.118	0.069	0.075
1 10 <sup>-3</sup>	0.150	0.138	0.075	0.079

- 1) Tracer V<sub>0</sub> f (S<sub>0</sub>) pour chacune des expériences.
- 2) Comparer les résultats obtenus avec les inhibiteurs avec celui obtenu pour l'expérience réalisée en absence d'inhibiteur.
- 3) Déterminer la nature d'inhibition pour chacun des inhibiteurs.
- 4) Déterminer V<sub>max</sub> et K<sub>m</sub> pour l'expérience réalisé sans inhibiteur.
- 5) Déterminer V'<sub>max</sub>, K'm et K<sub>i</sub> pour chacun des inhibiteurs.
- 6) Dans chacun des cas précédents, quelle concentration de substrat utiliseriez-vous pour montrer l'effet de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique ?

## Rappel sur les inhibitions :

### 1) Inhibition Compétitive :

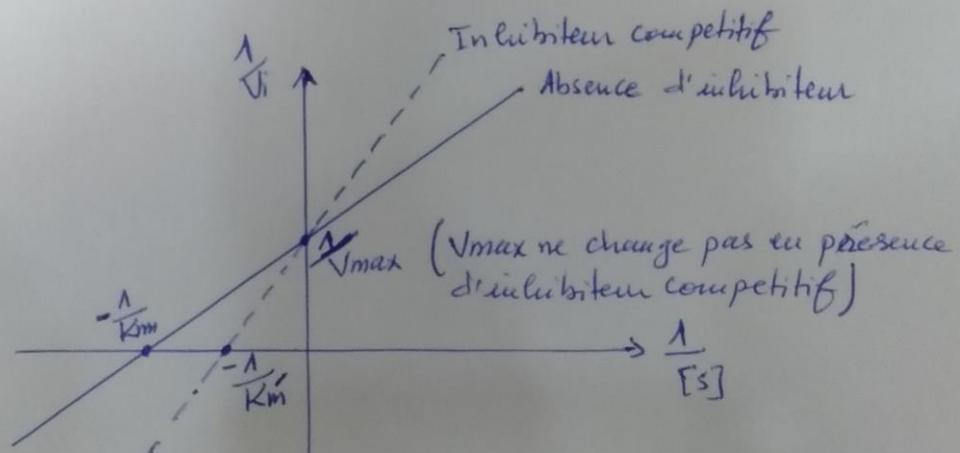


$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{\underbrace{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}_{\parallel K_m'}} + [S]$$

$$\Rightarrow V_{\max} = V_{\max}$$

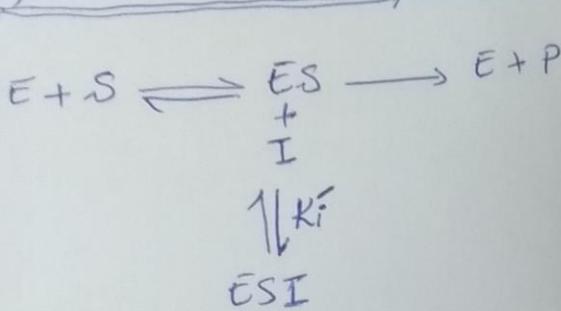
$$K_m' \neq K_m \quad \left( K_m' = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \right)$$

([I] = concentration de l'inhibiteur)  
(K<sub>i</sub> = la constante d'inhibition)



$K_m' > K_m$  en présence d'inhibiteur compétitif  $\Rightarrow$  l'affinité de l'enzyme pour le substrat diminue.

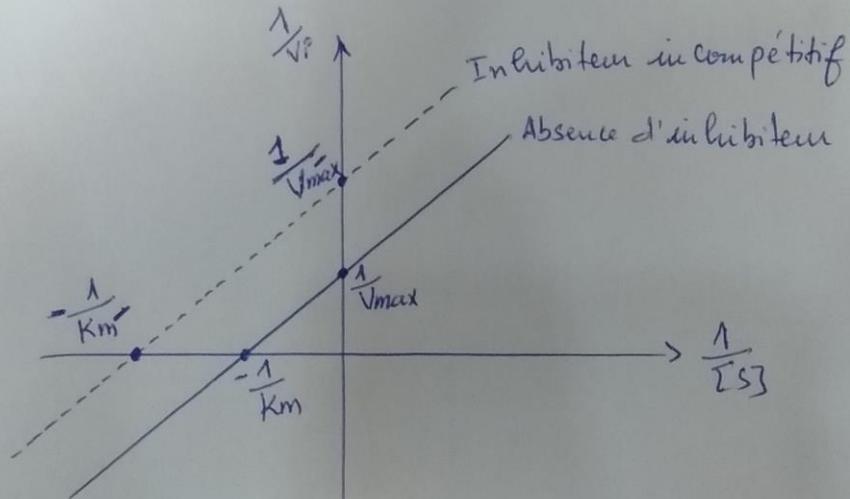
## 2) Inhibition Incompétitive :



L'inhibiteur se lie uniquement au complexe enzyme-substrat, donc le substrat et l'inhibiteur ont deux sites différents, mais le site de fixation de l'inhibiteur est caché lorsque le substrat n'est pas lié à l'enzyme.

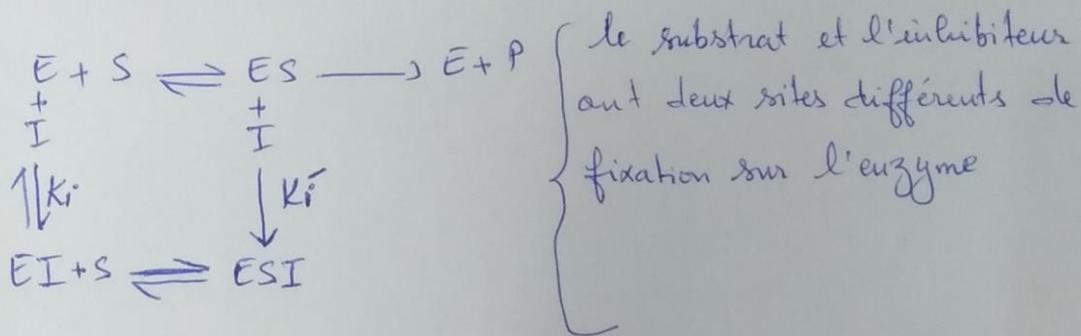
$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]}$$

$$\Rightarrow \begin{cases} V_{\max} \neq V_{\max} & \left( V_{\max} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \right) \\ K_m \neq K_m & \left( K_m = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \right) \end{cases}$$



En présence d'un inhibiteur incompétitif,  $V_{\max}$  et  $K_m$  diminuent d'un facteur égal  $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ , c'est pour cela qu'on a deux droites ~~per~~ parallèles. (2)

### 3) Inhibition Non Competitive :



$$V_i = \frac{V_{max} [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right) \left( K_m \left( \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} \right) + [S] \right)} \Rightarrow V_{max} \neq V_{max} \left( V_{max} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)} \right)$$

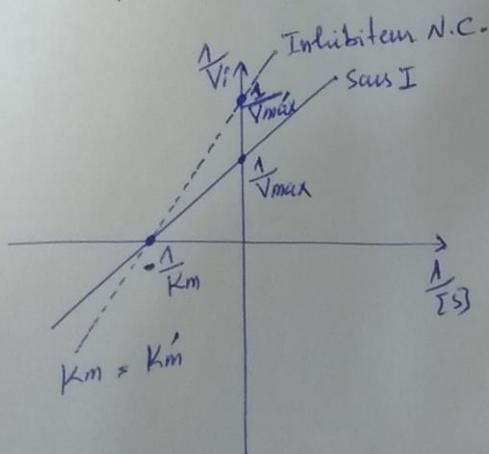
- pour  $K_m$ , on a deux cas expliqués ci-dessous.

#### 3-1) Inhibition non Competitive simple (pure)

$$K_i = K_i' \text{ (dans ce cas : } K_m = K_m')$$

dans ce cas on a :

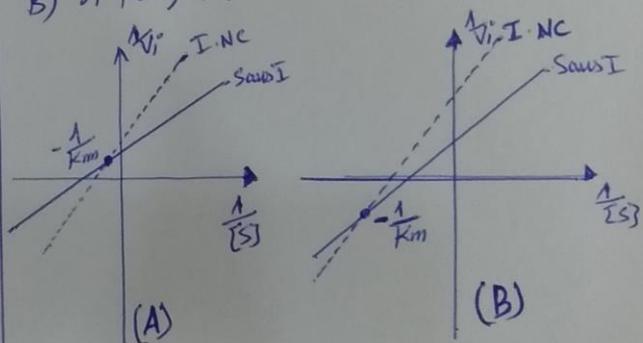
$$V_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$



#### 3-2) Inhibition non Competitive mixte

$K_i \neq K_i'$  dans ce cas, on a aussi 2 cas :

- A) si  $K_i < K_i' \Rightarrow K_m$  augmente.
- B) si  $K_i > K_i' \Rightarrow K_m$  diminue



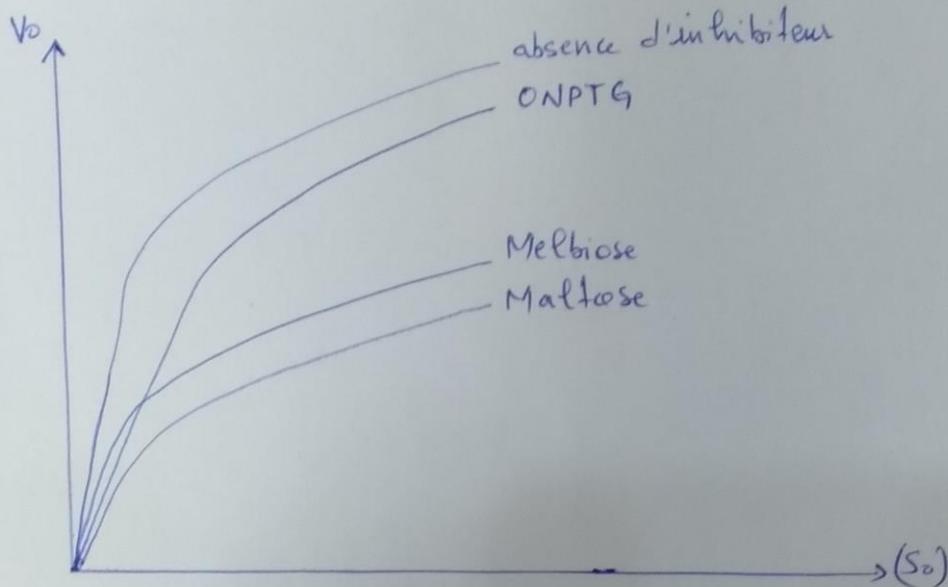
A) quand l'affinité de l'inhibiteur pour la forme libre de l'enzyme ( $K_i$ ) est inférieure à son affinité pour le complexe  $E-S$  ( $K_i'$ ),  $K_m$  augmente, le point d'intersection se situe au dessus de l'axe des abscisses

B) quand  $K_i > K_i'$ ,  $K_m$  diminue (point d'intersection au dessous de l'axe des abscisses).

(3)

## Correction :

1) tracer  $V_0$  f ( $S_0$ ) pour chacune des expériences :



④ On remarque que la cinétique obtenue est sous forme d'une hyperbole  $\Rightarrow$  la cinétique est michaelienne.

④ On comparant la cinétique sans Inhibiteur avec celle en présence des trois inhibiteurs (ONPTG, Melbiose, Maltose), on remarque que une réduction de l'activité enzymatique, c.à.d  $V_0$  diminue. Cette diminution est minimale en présence de l'ONPTG (donc, on peut soupçonner que l'ONPTG est un inhibiteur compétitif, mais on peut pas le confirmer pour le moment), par contre cette diminution est beaucoup plus accrue en présence du Melbiose et du maltose (donc, on peut soupçonner que ces derniers sont soit des inhibiteurs incompétitifs, soit Non compétitif, mais on peut pas aussi le confirmer pour le moment)

2) Comparer les résultats obtenus avec les inhibiteurs avec celui obtenus pour l'expérience en absence d'inhibiteur

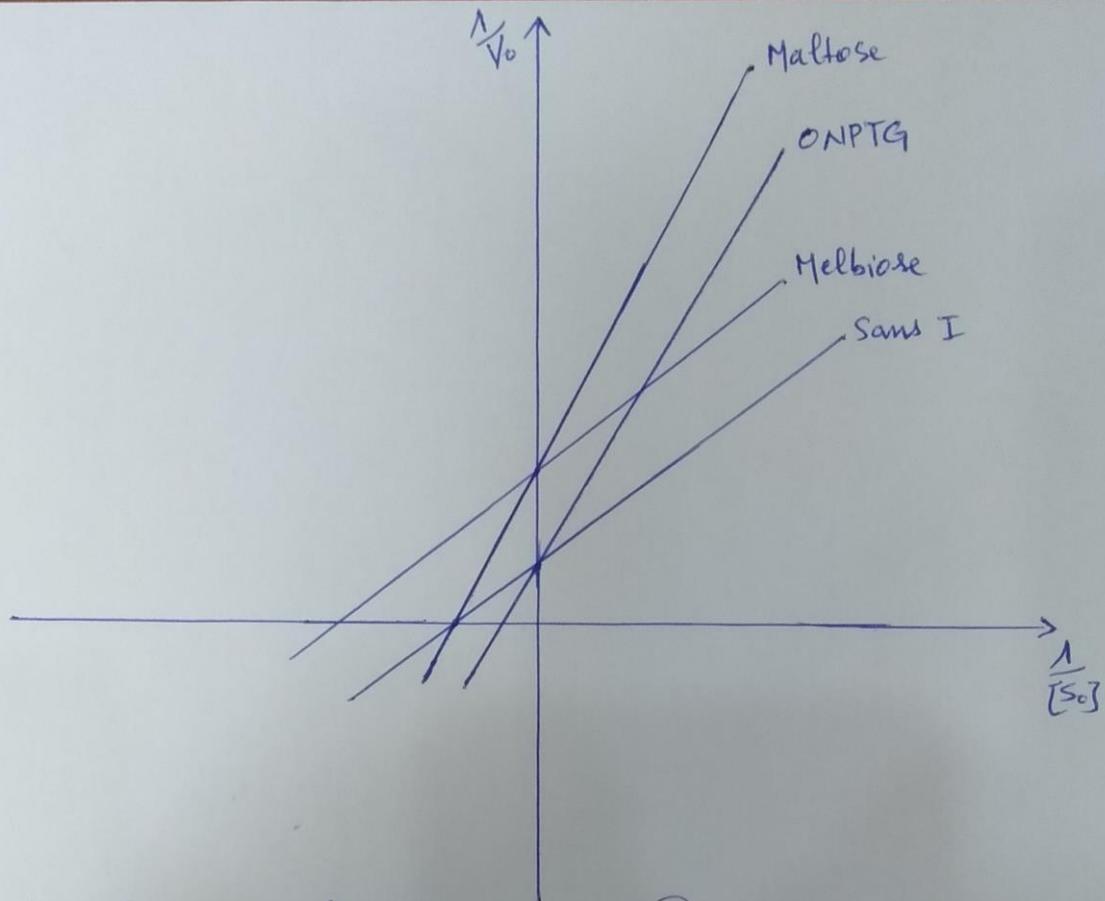
pour pouvoir comparer, on doit tracer  $\frac{1}{V_0}$  f  $(\frac{1}{S_0})$  pour toute les expériences sur le même graphique.

$\frac{1}{[S]}$	$10^4$	4	2	1	0,4	0,2	0,1
$\frac{1}{V_0}$ Sans I	30,3	18,18	12,12	8,47	7,24	6,66	
$\frac{1}{V_0}$ ONPTG	55,55	30,3	18,18	10,98	8,47	7,42	
$\frac{1}{V_0}$ Melbiose	37,03	24,39	18,18	14,49	13,33	12,65	
$\frac{1}{V_0}$ Maltose	69,6	36,36	24,39	16,94	14,49	13,33	

échelle :  $\frac{1}{[S]}$  : 1cm  $\rightarrow 0,5 \times 10^4$

$\frac{1}{V_0}$  : 1cm  $\rightarrow 6$

$\frac{1}{[S]}$ Cm	8	4	2	0,8	0,4	0,2
$\frac{1}{V_0}$ sans I Cm	5,05	3,03	2,02	1,41	1,2	1,11
$\frac{1}{V_0}$ ONPTG Cm	9,25	5,05	3,03	1,83	1,41	1,23
$\frac{1}{V_0}$ Melbiose Cm	6,17	4,06	3,03	2,41	2,22	2,1
$\frac{1}{V_0}$ Maltose Cm	10,1	6,06	4,06	2,82	2,41	2,22



On va comparer la droite de chaque inhibiteur avec celle en absence d'inhibiteur

1) ONPTG :  $v_{max} = v_{max}$   
 $K_m \neq K_m'$  }  $\Rightarrow$  inhibition compétitive.

2) Maltose :  $v_{max} \neq v_{max}$   
 $K_m = K_m'$  } inhibition non compétitive (simple)

3) Melbiose :  $v_{max} \neq v_{max}$   
 $K_m \neq K_m'$  } inhibition incompétitive.

Nous avons donc répondu à la question 3 pour déterminer la nature d'inhibition.

⑥

4) Determination de  $V_{max}$  et  $K_m$  pour l'expérience réalisée sans inhibiteur :

d'après le graphe :

$$\frac{1}{V_{max}} \leq 1 \text{ cm} \times 6 \Rightarrow V_{max} \leq \frac{1}{6} \Rightarrow V_{max} \leq 0,166 \text{ DO/min}$$

↑  
échelle

$$-\frac{1}{K_m} \leq -2 \times 0,5 \cdot 10^4 \Rightarrow K_m \leq \frac{1}{1 \cdot 10^4} \Rightarrow K_m \leq 10^{-4} \text{ M}$$

5) Determination de  $V_{max}$ ,  $K_m'$  et  $K_i$  pour chacun des inhibiteurs :

~~$V_{max}$~~

1) ONPTG : (inhibiteur compétitif)

$$V_{max}' \leq V_{max} \leq 0,166 \text{ DO/min}$$

$$-\frac{1}{K_m'} \leq -1 \times 0,5 \cdot 10^4 \Rightarrow K_m' \leq \frac{1}{0,5 \cdot 10^4} \Rightarrow K_m' \leq 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$\text{on a : } K_m' \leq K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \Rightarrow \frac{K_m'}{K_m} \leq 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$\Rightarrow \frac{K_m'}{K_m} - 1 \leq \frac{[I]}{K_i}$$

$$\Rightarrow K_i \leq \frac{[I]}{\frac{K_m'}{K_m} - 1}$$

$$\Rightarrow K_i \leq \frac{3 \cdot 10^{-4}}{\frac{2 \cdot 10^{-4}}{10^{-4}} - 1}$$

$$\Rightarrow K_i \leq 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

(7)

2) Maltose (inhibiteur non compétitif simple)

$$\frac{1}{V_{\max}} = 2 \times 6 \Rightarrow V_{\max} = \frac{1}{12} \Rightarrow \boxed{V_{\max} = 0,083 \text{ DO/min}}$$

$$-\frac{1}{K_m'} = -\frac{1}{K_m} \Rightarrow \boxed{K_m' = 10^{-4} \text{ M}} \rightarrow \text{calculé précédemment pour l'expérience sans inhibiteur}$$

$$V_{\max}' = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \Rightarrow \frac{V_{\max}}{V_{\max}'} = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$
$$\Rightarrow \frac{V_{\max}}{V_{\max}'} - 1 = \frac{[I]}{K_i}$$

$$\Rightarrow K_i = \frac{[I]}{\frac{V_{\max}}{V_{\max}'} - 1}$$

$$\Rightarrow K_i = \frac{0,25}{\frac{0,166}{0,083} - 1}$$

$$\Rightarrow \boxed{K_i = 0,25 \text{ M}}$$

3) Melbiose (inhibiteur incompétitif)

$$\frac{1}{V_{\max}} = 2 \times 6 \Rightarrow V_{\max} = \frac{1}{12} \Rightarrow V_{\max}' = \boxed{0,083 \text{ DO/min}}$$

$$-\frac{1}{K_m'} = -4,0 \times 0,5 \cdot 10^4 \Rightarrow K_m' = \frac{1}{2 \cdot 10^4} \Rightarrow \boxed{K_m' = 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}}$$

8

pour calculer  $K_i$ , on prend soit :

$$V_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

ou

$$K_m' = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

donc on aura :  $K_i = \frac{[I]}{\frac{V_{\max}}{V_{\max}} - 1}$

$$K_i = \frac{0,17}{\frac{0,166}{0,083} - 1}$$

$$K_i = 0,17 \text{ M}$$

6) Quelle [S] on peut utiliser pour montrer l'effet de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique.

1) ONPTG (inhibition compétitive)

Dans l'inhibition compétitive, l'inhibiteur se lie au même site que le substrat, c'est le site catalytique. Si on utilise des [S] faibles, on va avoir la formation des deux complexes E-S et E-I, donc, on peut observer l'effet de l'inhibiteur, par contre, si on utilise des [S] élevées, c'est-à-dire saturantes (l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat est plus élevée que celle de l'enzyme pour l'inhibiteur), on pourra pas avoir la formation du complexe E-I, mais seulement le complexe E-S qui sera formé. (9)

donc, pour pouvoir observer l'effet d'un inhibiteur compétitif (c'est-à-dire la formation du complexe  $E-I$ ) on doit travailler à des concentrations non saturantes du substrat.

## 2) Maltose (I Non compétitive) et Melbiose (I incompétitive)

Dans les inhibitions non compétitives et incompétitives, le site de fixation de l'inhibiteur est différent de celui du substrat. Si on travaille soit à de faibles  $[S]$  ou à des  $[S]$  élevées (saturantes), on va toujours avoir la formation du complexe  $E-S-I$ , donc, on pourra observer l'effet de l'inhibiteur.

Donc, dans ces deux cas, on pourra travailler à n'importe quelle  $[S]$ , l'effet de l'inhibiteur sera toujours observé.

TACHERFIOUT M.

