

**Examen d'enzymologie
 01H30**

Exercice 1 ; L'activité de la protéine kinase A (PKA) de masse molaire 120 000 g/mol est testée après chaque étape de purification : 10µl de solution enzymatique dans 1 ml de milieu réactionnel se traduit par de 16 micromoles (pour E_i), 59 micromoles (pour E₁) ou 75 micromoles (pour E₂) de substrat transformé par minute.

1. Compléter le tableau suivant en donnant un exemple de calcul pour l'Activité Enzymatique totale, le facteur de purification et le rendement.

Etape d'extraction	Volume récupéré	Quantité de protéine totale	Activité Enzymatique totale	Facteur de purification	Rendement
Extrait initial (E _i)	50 ml	1,2 g			
Étape 1 (E ₁)	12 ml	0,0354 g			
Étape 2 (E ₂)	8 ml	0,03 g			

2. L'enzyme obtenue à la fin du procédé est probablement pure. Justifier.
 3. Pour confirmer la pureté de l'enzyme, la solution enzymatique E2 a été analysé par SDS-PAGE. Le profil électrophorétique montre deux bandes de migration correspondant à 45 KD et 15 KD. Que conclure de ce résultat ?
 4. L'activité de la phosphorylation d'un substrat S a été suivie en présence de PKA purifiée et dialysée sur une membrane semi perméable, des fractions de PKA de 45 KD et 15 KD et de PKA purifiée en présence de cAMP. Les résultats obtenus sont :

	PKA Dialysée	PKA Dialysée + cAMP	Fraction PKA45	Fraction PKA15
Activité enzymatique	---	+++	++	---

Quelles sont les informations que vous pouvez déduire de ces résultats ?

Exercice 2

Le DFMO, un inhibiteur irréversible de l'ornithine décarboxylase, est une substance à activité antiparasitaire utilisé pour traiter la maladie du sommeil (action sur le trypanosome).

- A quel type d'inhibiteur irréversible appartient le DFMO ? Écrire le schéma réactionnel de l'action de cet inhibiteur.
- Quelles sont les propriétés caractéristiques de ce type d'inhibiteur.

Exercice 3

Les résultats de l'étude cinétique de la réaction $A + B \rightarrow C + D$ sont représentés dans les figures 1a et 1b et le tableau 2.

- Quel est le mécanisme mis en jeu dans cette réaction ?
- Déterminer les paramètres cinétiques V_{max}, K_{mA} et K_{mB}
- En déduire les valeurs des constantes d'inhibition des produits C et D

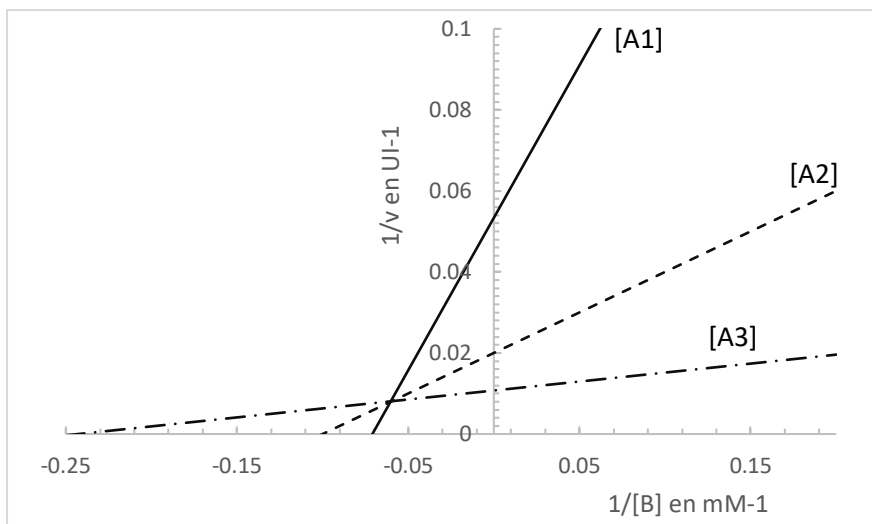


Figure 1a : $1/V$ en fonction de $1/B$ à différentes concentrations constantes de A

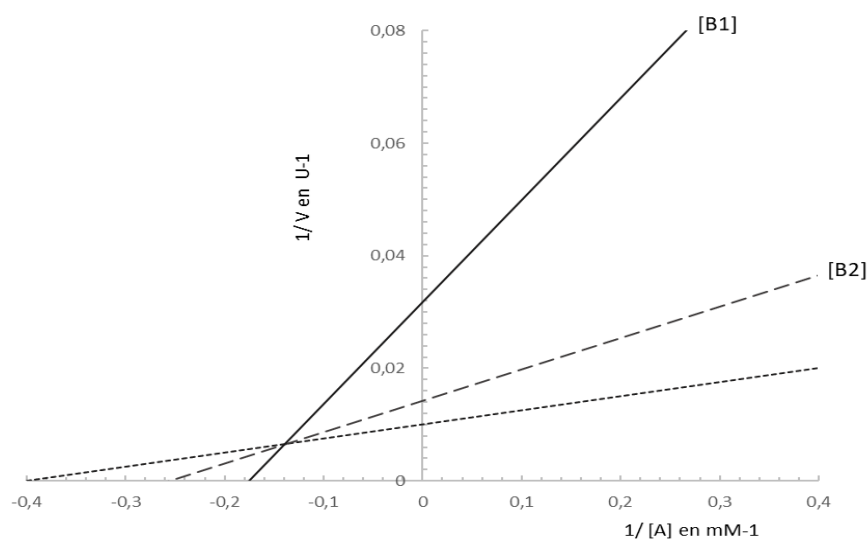


Figure 1b : $1/V$ en fonction de $1/A$ à différentes concentrations constantes de B

TABLEAU 2 : résultats de l'inhibition par les produits C et D

	Substrat A Variable et Substrat B constant		Substrat B Variable et Substrat A constant	
En présence de 100 mM du produit C	V_{max} inchangé	$K_m A$ change $K_m A \text{ app} = 7.5 \text{ mM}$	V_{max} inchangé	$K_m B$ change
En présence de 100mM du produit D	V_{max} inchangé	$K_m A$ change $K_m B \text{ app} = 15 \text{ mM}$	V_{max} inchangé	$K_m B$ change

Bon travail
PR khettal bachra