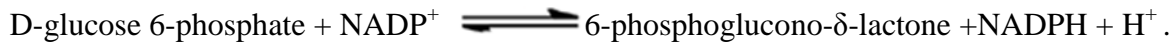


Exercice 1(6 Pts) : La glucose 6-phosphatase (G 6-PD) catalyse la réaction suivante :



Dans le globule rouge humain , l'activité spécifique de la G6-PD normale est 1.4 UI par ml de globule rouge. Le D-glucose 6-phosphate restant en excès pendant tout le temps de la mesure.

Quel sera le temps nécessaire à la conversion de 100 µg de D-glucose 6-phosphate (PM : 260) en 6-phosphoglucono-δ-lactone, par 0.5 ml de globule rouge ?

Réponse :

1- On calcule l'activité spécifique (UI ou µmole/min./ml)

1 ml de globules rouges contenant \longrightarrow 1.4 UI

0.5 ml de globules rouges contenant \longrightarrow X

$$x = 1.4 \times 0.5 = \mathbf{0.7 \text{ UI} (2.Pts)}$$

donc 0.5 ml de globules rouges contenant 0.7 UI de G6-PD peut convertir 0.7 µmole de D-glucose 6-phosphate par minute.

2-On calcule le nombre de mole de D-glucose 6-phosphate transformé.

Nmole = masse en g/poids moléculaire

$$\text{Nmole} = 10^{-4} / 260 = 3.85 \cdot 10^{-7} = 0.385 \text{ µmole de D-glucose 6-phosphate (2.pts)}$$

On a 0.7 µmole transformée en \longrightarrow 60 secondes (1.min)

Si on a 0.385 µmole transformée en \longrightarrow x secondes

$$\text{D'où } X = \frac{0.385}{0.7} = \mathbf{33 \text{ secondes}}$$

Donc le temps nécessaire à la conversion de 100µg de D-glucose 6-Phosphate en phosphogluconoδ-lactone par, 0.5 ml de globules rouges est : **33 secondes (2 pts)**

Exercice 02(8 Pts)

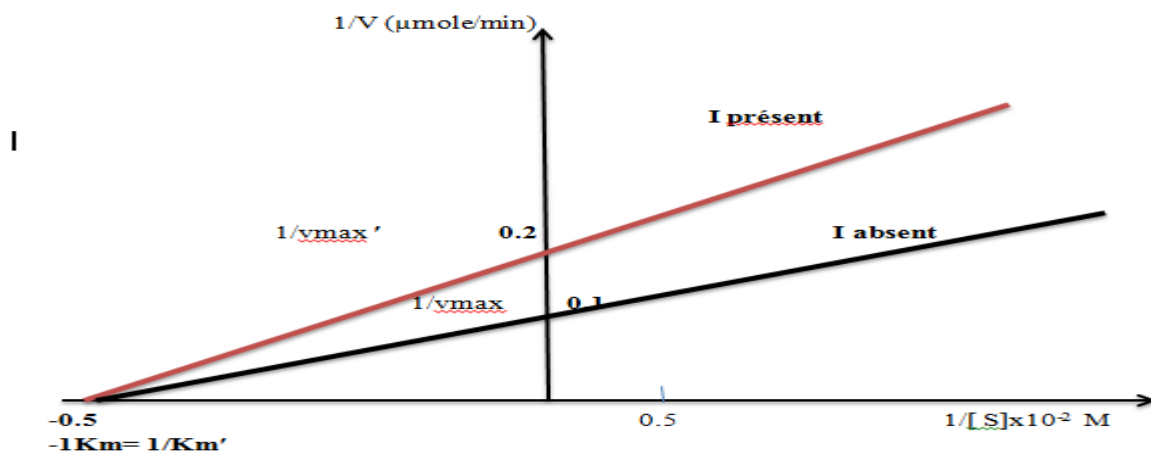
S et I sont respectivement un substrat et un inhibiteur d'une enzyme. On mesure v_i (μmole de substrat consommé par minute) pour différentes concentrations initiales de S, en l'absence et en présence de I.

[S] $\times 10^3$ M	1/[S] $\times 10^3$ M	I absent		I présent	
		V($\mu\text{mol}/\text{min}$)	1/V $\mu\text{mole}/\text{min}$	V($\mu\text{mol}/\text{min}$)	1/V $\mu\text{mole}/\text{min}$
2	0.5	5	0.2	2.50	0.4
5	0.2	7.14	0.14	3.57	0.28
7.5	0.13	7.87	0.127	3.95	0.25
10	0.1	8.34	0.11	4.17	0.23
20	0.05	9.09	0.11	4.54	0.22
	0.5 Pt		0.25 Pt		0.25 Pt

- 1)- Préciser le type de l'inhibition exercée par I sur l'enzyme
- 2)- Déterminer K_m et V_{max} en l'absence et en présence de I.
- 3)- Calculer la constante de dissociation K_I du complexe enzyme-inhibiteur.

Réponse :

- 1- Pour déterminer le type d'inhibition, K_m et v_{max} on applique la représentation de Lineweaver-Burk en reportant $1/v$ en fonction de $1/[S]$, donc on doit calculer $1/v$ et $1/[S]$. (voir tableau ci-dessus). **0.5. pt**



2.00 pt

2- Après l'extrapolation, les droites obtenues se coupent sur l'axe des $1/[S]$ au point **-0.5** qui correspond aux $-1/K_m$ et $-1/K_m'$, l'inhibiteur n'a pas modifié l'affinité du substrat pour l'enzyme **0.5 pt :**

Donc (I) exerce une inhibition **non compétitive (1.00 pt)** sur l'enzyme.

3-

- a)- On calcule le K_m et V_{max} en absence de l'inhibiteur

$$-1/K_m = -0.5 \times 10^2 \longrightarrow K_m = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M } \mathbf{0.5 \text{ pt}}$$

$$1/v_{\max} = 0.1 \longrightarrow v_{\max} = 10 \text{ } \mu\text{mole/min } \mathbf{0.5 \text{ pt}}$$

b)- On calcule le K_m et V_{\max} en présence de l'inhibiteur

$$-1/K_m' = -0.5 \longrightarrow K_m' = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M } \mathbf{0.5 \text{ pt}}$$

$$1/v_{\max}' = 0.2 \longrightarrow V_{\max}' = 5 \text{ } \mu\text{mole/min } \mathbf{0.5 \text{ pt}}$$

4- après extrapolation, la droite obtenue en présence de l'inhibiteur I coupe l'axe des 1/V en un point d'ordonnée $1/v_{\max}' = 1/v_{\max}(1 + [I]/K_I)$ **0.5 pt**

$$0.2 = 0.1(1 + 1.5/K_I)$$

$$0.2 = 0.1 + 1.5 \times 0.1 / K_I$$

$$0.2 - 0.1 = 0.15 / K_I \longrightarrow K_I = 0.15 / 0.1 = 1.5 \text{ M.} \mathbf{0.5 \text{ pt}}$$

Exercice 3 (6 Pts)

A)- décrire les éléments qui doivent être pris en considération pour la purification des protéines enzymatiques.

B)- Dans un tableau faites une comparaison entre les inhibiteurs : compétitif, non compétitif et incompétitif.

Réponse :

A) **(3 Points)** les éléments qui doivent être pris en considération pour la purification des protéines enzymatiques son :

1-La reconnaissance des caractéristiques de la matière première(0.5 pt) :

- sa nature (liquide, solide), **0.25 pt**
- son origine (animal, végétal, microbien), **0.25pt**
- sa structure biologique (cellulaire, tissulaire). **0.25 pt**

2- la localisation des produits recherchés.0.25pt

(mitochondrie, cytoplasme, membrane...) **0.25pt**

- Connaissance ses propriétés structurales et physico-chimiques (poids moléculaire, organisation structurale, constante cinétiques, stabilité moléculaire, pH optimum, point isoélectrique), activateurs et inhibiteurs. **0.25 pt**

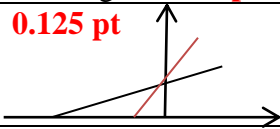
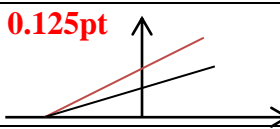
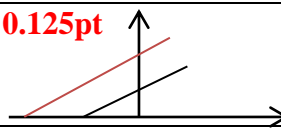
3-Il faut un procédé de libération de la protéine sous forme soluble, sans perte d'activité des enzymes.0.25pt

4-Pour ne pas détruire de l'édifice des enzymes,0.25pt

- On doit opérer généralement à basse température (+4C°, appareil réfrigéré, réactifs refroidis **0.25 pt...)**

- On utilise des milieux tamponnés, contenant ou non des agents protecteurs comme Éthylène Diamine Tétra-Acétique(EDTA) β-mercaptoéthanol...) aussi rapidement que possible. **0.25pt**

B)- Comparaison entre les inhibiteurs compétitifs, non compétitif et incompétitifs :

	I compétitif	Non compétitif	Incompétitif
1Fixation avec l'enzyme :	En compétition avec le S, mais Réversible 0.25 pt	Pas de compétition avec le S, 0.25 pt	Se fixe sur le complexe ES. 0.25 pt
Km	Augmenté. 0.25 pt	Inchangée. 0.25 pt	Diminué 0.25 pt
Affinité de l'enzyme pour son substrat	Diminuée. 0.125 pt	Inchangée. 0.125 pt	Augmentée 0.125 pt
Vmax :	Inchangée. 0.125pt	Diminuée 0.125	Diminuée 0.125
Représentation Line weaver/Burk	0.125 pt 	0.125pt 	0.125pt 
Ordonnée d'origine	$1/v_{max}$ 0.125 pt	$1/v_{max}(1+[I]/K_I)$ 0.125 pt	$1/v_{max}(1+[I]/K_I)$ 0.125 pt