

TRAVAUX DIRIGES DE BIOCHIMIE SV4 CORRIGE TD d'Enzymologie – Partie 3

Exercice 6 :

La L-Lactate déshydrogénase catalyse dans certaines conditions la réduction réversible du Pyruvate en L-Lactate selon la réaction suivante:

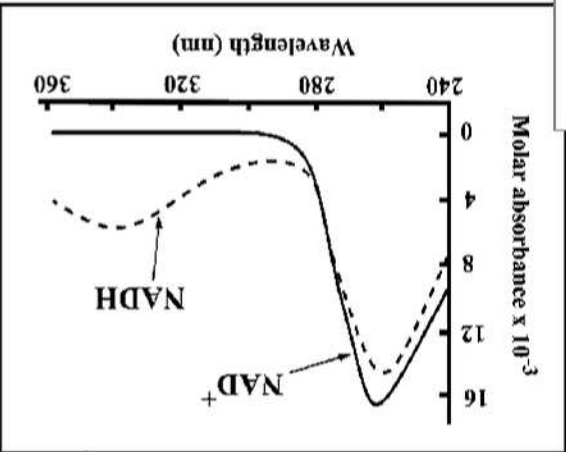
$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-Lactate} + \text{NAD}^+$$

 Les vitesses initiales de la réaction sont déterminées pour différentes concentrations $[\text{S}]_0$ de pyruvate. La concentration du NADH est constante et égale à $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et $K_{\text{M}}^{\text{NADH}} = 5,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.
 On suit la disparition du NADH à $\lambda = 340 \text{ nm}$ en fonction du temps. Données : $\epsilon_{\text{NADH}}^{\text{NADH}} = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; U.A. = unité d'absorbance

$[\text{S}]_0 \text{ (mM)}$	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1	2	3	4	5	9
$V_i \text{ (U.A.} \cdot \text{min}^{-1})$	0,075	0,125	0,157	0,180	0,200	0,212	0,232	0,250	0,270	0,270	0,250	0,240	0,190

1. Tracez la courbe de saturation et commentez l'allure.

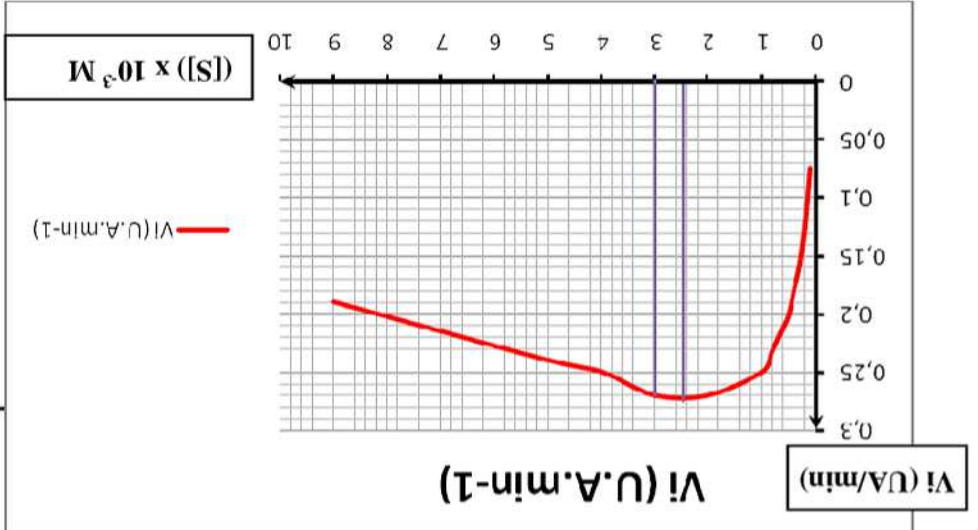
→ Cette enzyme utilise le NADH, H^+ comme coenzyme pour réduire le Pyruvate. Il faut stoechiométriquement une molécule de NADH, H^+ pour réduire chaque molécule de pyruvate. On peut donc suivre l'évolution de la réaction en dosant par spectrophotométrie la quantité de NADH disparu, c'est-à-dire réduit en NAD^+ . Ce suivi est en effet possible puisque le NADH, H^+ présente l'avantage d'absorber sélectivement et spécifiquement la lumière à $\lambda = 340 \text{ nm}$ tandis que les autres réactifs (Pyruvate, Lactate ou NAD^+ formé) n'absorbent pas ou peu à cette longueur d'onde. -voir figure →



Comme le montre la figure ci-contre, le NADH absorbe à $\lambda = 340 \text{ nm}$, tandis que le NAD^+ n'absorbe pas la lumière. On exploite cette propriété pour suivre la réaction directement à $\lambda = 340 \text{ nm}$.
 On suit la disparition du NADH selon l'expression de vitesse initiale:

$$V_i = -d[\text{S}]/dt = - (d(\text{DO})/e_{\text{NADH}}^{\text{NADH}}) / dt$$

 On peut tracer directement la courbe de saturation avec la représentation de la Vitesse $V_i \text{ (U.A./min)}$ en fonction de $[\text{S}]_0$ ou en représentant V_i (en concentration/min) = $f([\text{S}])$.



A partir de cette courbe de saturation, on peut diviser le comportement de l'enzyme en deux : en présence de concentrations en Pyruvate inférieures à **3 mM**, la V_i augmente selon l'allure normale en hyperbole de Michaelis. Au-delà de 3 mM, la V_i diminue progressivement au fur et à mesure que $[\text{S}]$ augmente. Ce phénomène s'explique par l'effet de sur-saturation par excès de substrat qui peut amener à l'inhibition de l'activité de la LDH par excès de substrat (ici dans ce cas, l'enzyme n'est pas inhibée mais son activité diminue).

Le point (5, 10^{-3} M; 0,240) $\Rightarrow K_s = 13,01 \cdot 10^{-3}$ M // (ES + S $\xrightleftharpoons{K_s}$ ESS) \Rightarrow Plus $[S_0] \uparrow$, plus l'affinité pour ES \uparrow .
Exemple : le point expérimental de coordonnées : $[S_0] = 9 \cdot 10^{-3}$ M et $V_i = 0,190$ (U/A/min) $\Rightarrow K_s = 11,243 \cdot 10^{-3}$ M ;
 substrat) dans l'équation suivante : $K_s = (V_i \times [S]^2) / (V_{max} \cdot [S]) - V$ ($[S] + K_m$) qui varie en fonction de $[S_0]$.

On peut déterminer K_s en remplaçant les valeurs expérimentales d'un point (situé dans la zone d'inhibition par excès de $[S]$)
 $V_i = (V_{max} \cdot [S]) / (K_m + [S] + [S]^2 / K_s)$ où K_s est la constante qui traduit l'affinité du substrat pour le complexe $[ES]$
 L'expression de la vitesse initiale de la réaction enzymatique en présence d'un excès de substrat s'écrit :

Détermination de K_m : $K_m = a \times V_{max} = 0,36632 \times 10^{-3}$ M \Rightarrow affinité moyenne à faible pour le substrat.

Détermination de V_{max} : $V_{max} = (1/b) = 0,349825$ (U/A/min) = $(0,349825/6000) = 5,83042 \times 10^{-5}$ (M/min)

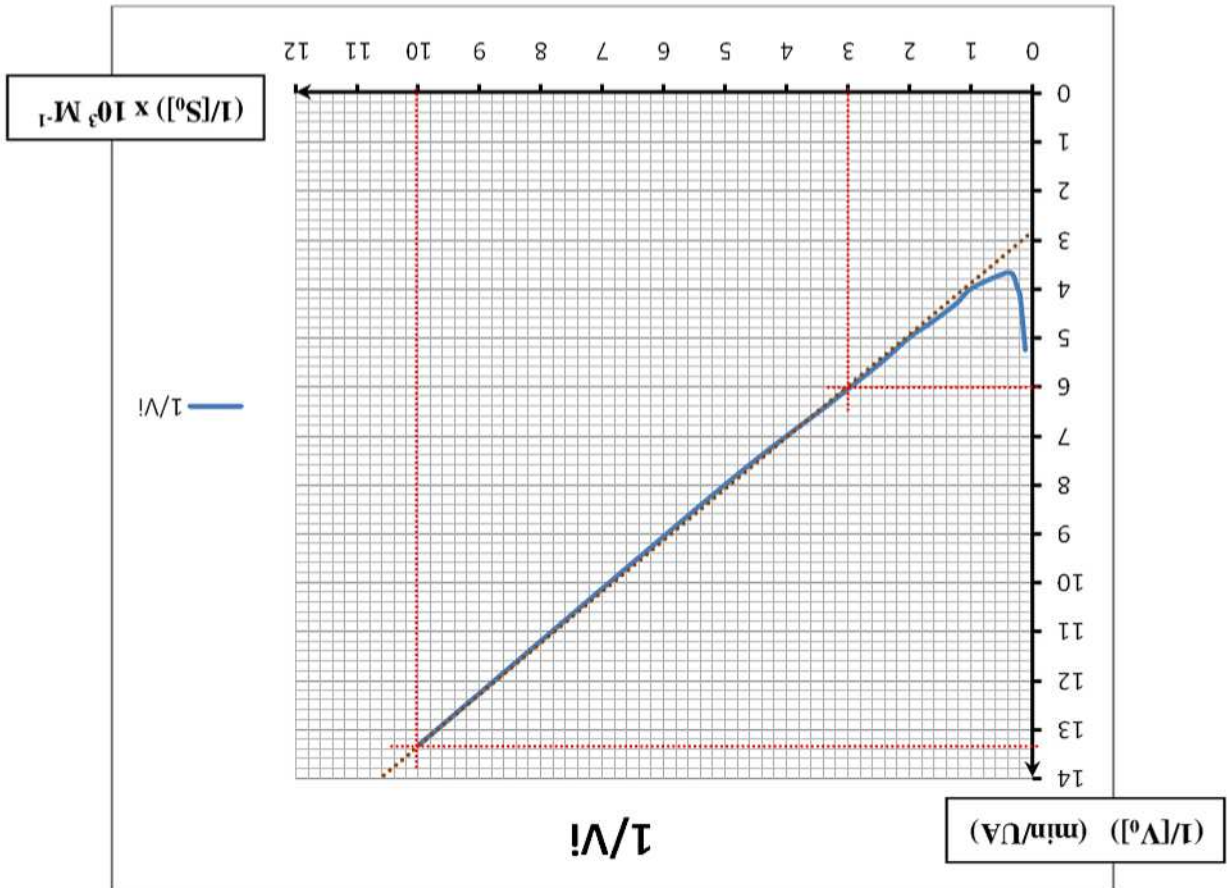
L'ordonnée apparente à l'origine : $b = (1/V_{max}) = (13,33) - (10 \times 10^3 \times 1,04714286 \times 10^{-3}) = 2,85857$ (min/U.A).
 La pente de la droite apparente est $a = (K_m/V_{max}) = (13,33 - 6,0)/(10^{-3}) \cdot 10^3 = 1,04714286 \times 10^{-3}$ (min. M/U.A).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

D'après la représentation en double inverse et le model mathématique de la Vitesse initiale :

déterminer K_m et V_{max} :

Aux concentrations inférieures à 3 mM en Pyruvate, cette LDH a un comportement Michaelien apparent : on peut donc



1/Vi (min. U.A ⁻¹)	13,33	8	6,369	5,555	5	4,717	4,31035	4	3,703	3,703	4	4,166	5,263
1/[S ₀] x 10 ³ M ⁻¹	10	5	3,33	2,5	2	1,667	1,25	1	0,5	0,333	0,25	0,2	0,111

En représentant $1/V_i$ en fonction de $1/[S_0]$: on obtient la courbe suivante :

2. Déterminez V_{max} et K_m par la représentation des doubles inverses ?