

Modélisation en enzymologie sous Régressi
(Protocole et résultats tirés des [TP de l'Agrégation interne de BGB session 2001](#))

Voici un protocole et les résultats correspondants à l'inhibition de l'activité enzymatique de l'invertase par excès de substrat (saccharose). Cette hydrolase catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose selon l'équation :



Mesure de la vitesse d'hydrolyse du saccharose à 30°C

Dans un tube à essais introduire :

- X mL de solution mère de saccharose à 2 mol/L en tampon pH 4.5
- (4.95 – x) mL de tampon pH 4.5
- 50 µL de solution d'invertase en tampon pH 4.5

Incuber 2 minutes

Prélever 1 mL de milieu réactionnel et transférer immédiatement dans un tube contenant 2 mL de réactif au 3.5 DNS.

Boucher au papier d'aluminium et porter au bain-marie bouillant 5 minutes exactement.

Refroidir en plongeant le tube dans un bain de glace fondante et ajouter 10 mL d'eau distillée.

Attendre 10 minutes et lire l'absorbance à 530 nm.

Tester les concentrations suivantes dans le milieu réactionnel : 20 ; 40 ; 80 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 600 ; 1000 ; 1500 mmol/L.

Résultats :

[S] mM	A530
0	0
20	0.522
40	0.862
80	1.260
100	1.370
200	1.433
400	1.500
600	1.410
1000	1.145
1500	0.802

Données : le KM de l'invertase est voisin de 50 mmol/L à pH 4.5.

Ces résultats peuvent être modélisés assez facilement sous Régressi afin de calculer les constantes V_{max} , KM et la constante d'inhibition k_{ss} .

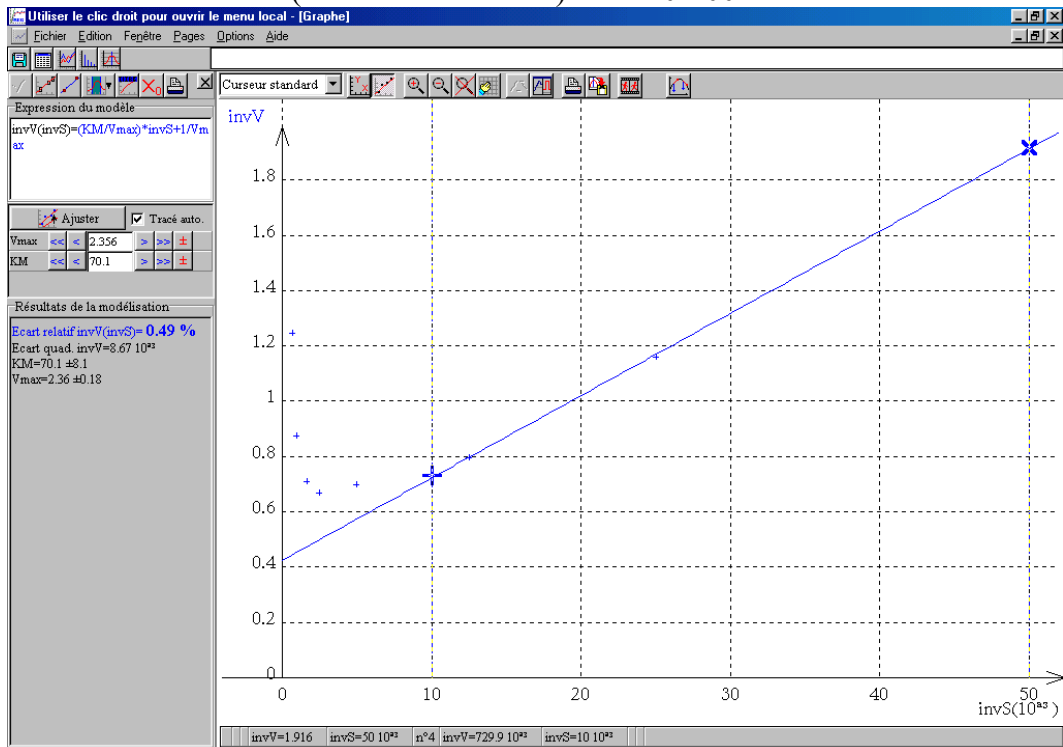
Dans un premier temps, déterminer KM et V_{max} sur la zone de concentrations où l'inhibition par excès de substrat n'entre pas en jeu :

On définit deux variables : S pour la concentration en substrat (en abscisse) et A530 en ordonnée qui correspond à l'absorbance du produit formé en deux minutes dosé par le 3.5 DNS.

Ensuite, on définit $invS=1/S$ et $invV=1/A520$. On représente $invV=f(invS)$ et on modélise :

$$invV=(KM/V_{max})*invS+1/V_{max}$$

Modélisation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) entre 20-100 mM



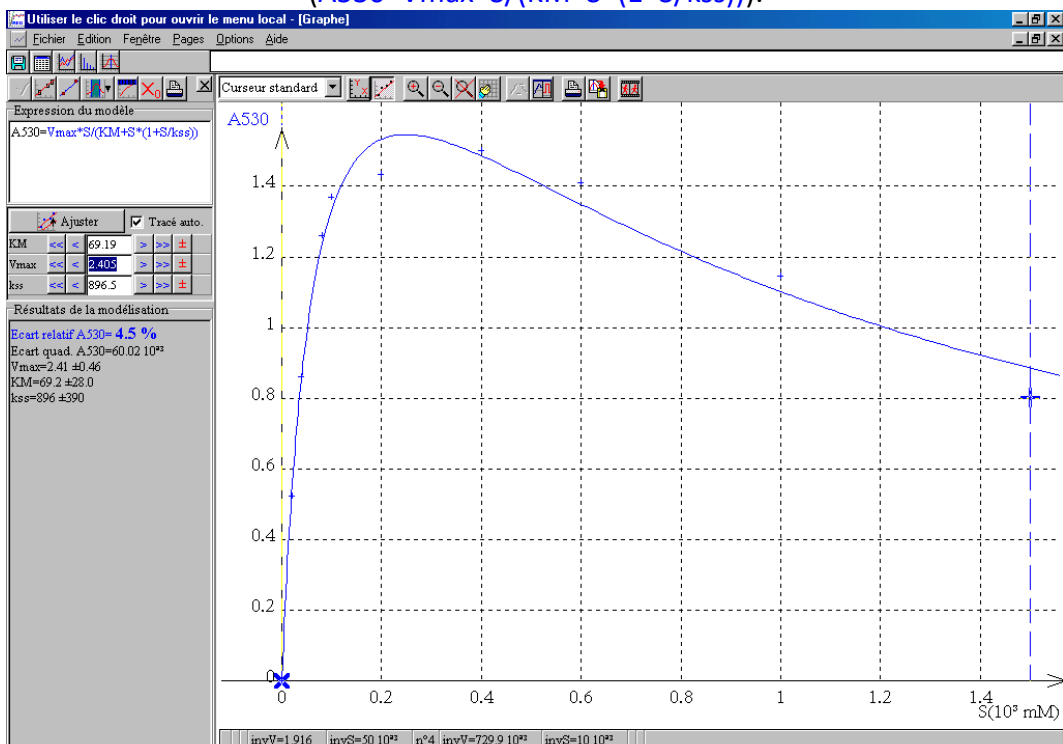
On détermine : $KM = 70.1 \text{ mM}$ $V_{\max} = 2.36 \text{ uA/2 min}$

On repasse en représentation directe $A_{530}=f(S)$ et on modélise sur l'ensemble des points par :

$$A_{530} = V_{\max} * S / (KM + S * (1 + S / k_{ss}))$$

Remarque : on peut dans un premier temps remplacer KM et V_{\max} par leur valeur numérique déterminée précédemment ($A_{530} = 2.36 * S / (70.1 + S * (1 + S / k_{ss}))$) et les remplacer ensuite par leur nom de variable afin d'ajuster le modèle

$$(A_{530} = V_{\max} * S / (KM + S * (1 + S / k_{ss}))).$$



Les valeurs calculées sont : $KM = 69.2 \text{ mM}$ $V_{\max} = 2.41 \text{ uA/2 min}$ $K_{ss} = 900 \text{ mM}$