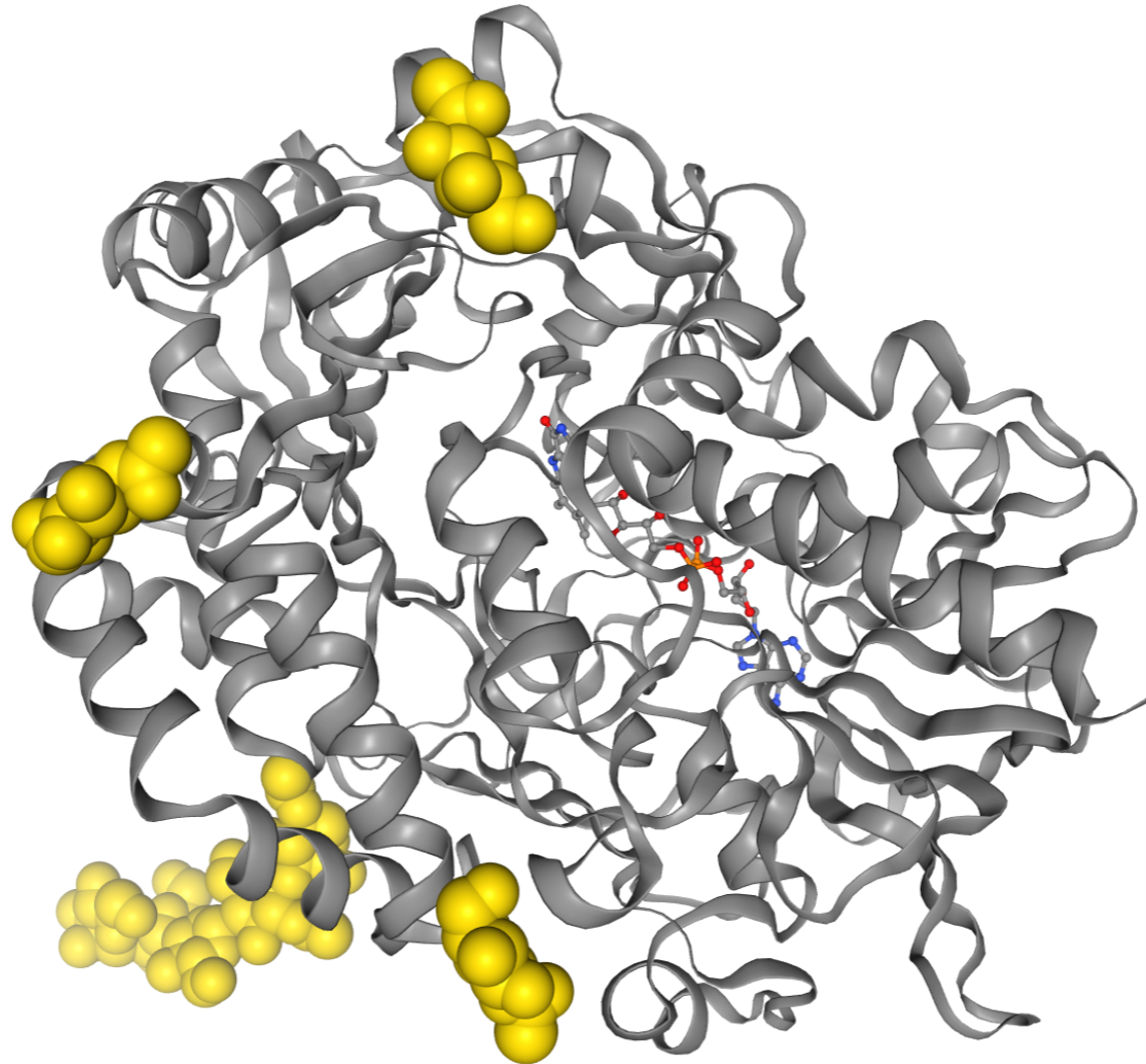
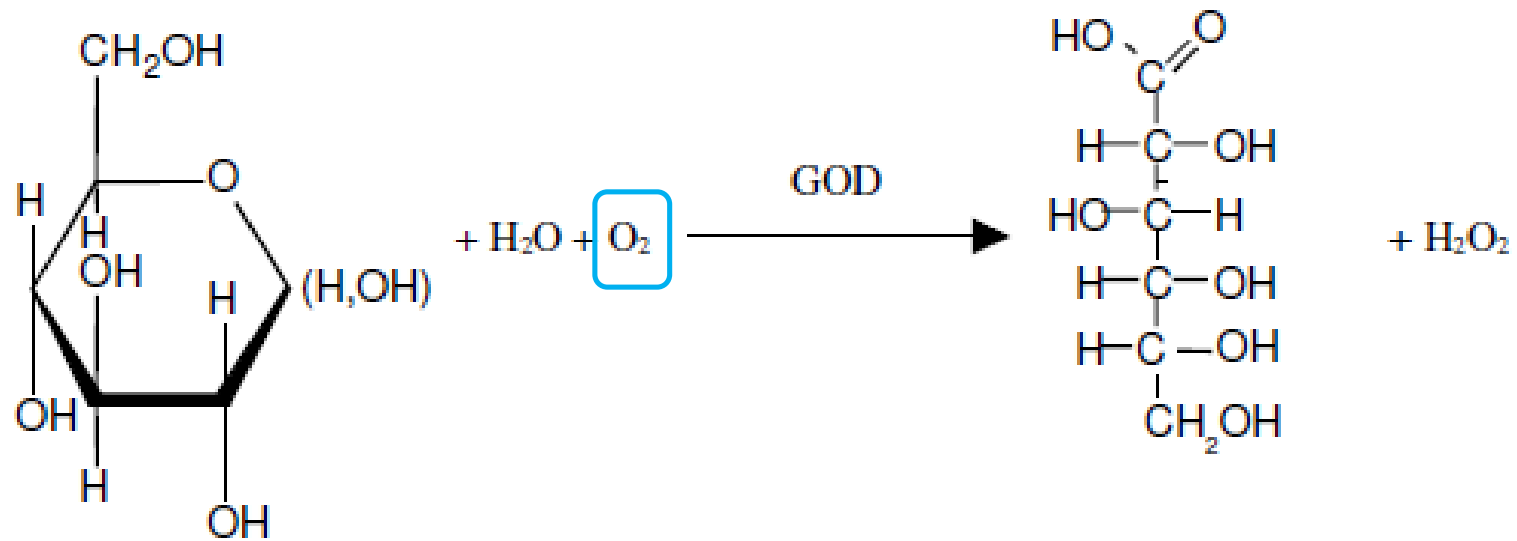


SV-E-3 TP : Cinétique enzymatique et son contrôle



Glucose oxydase

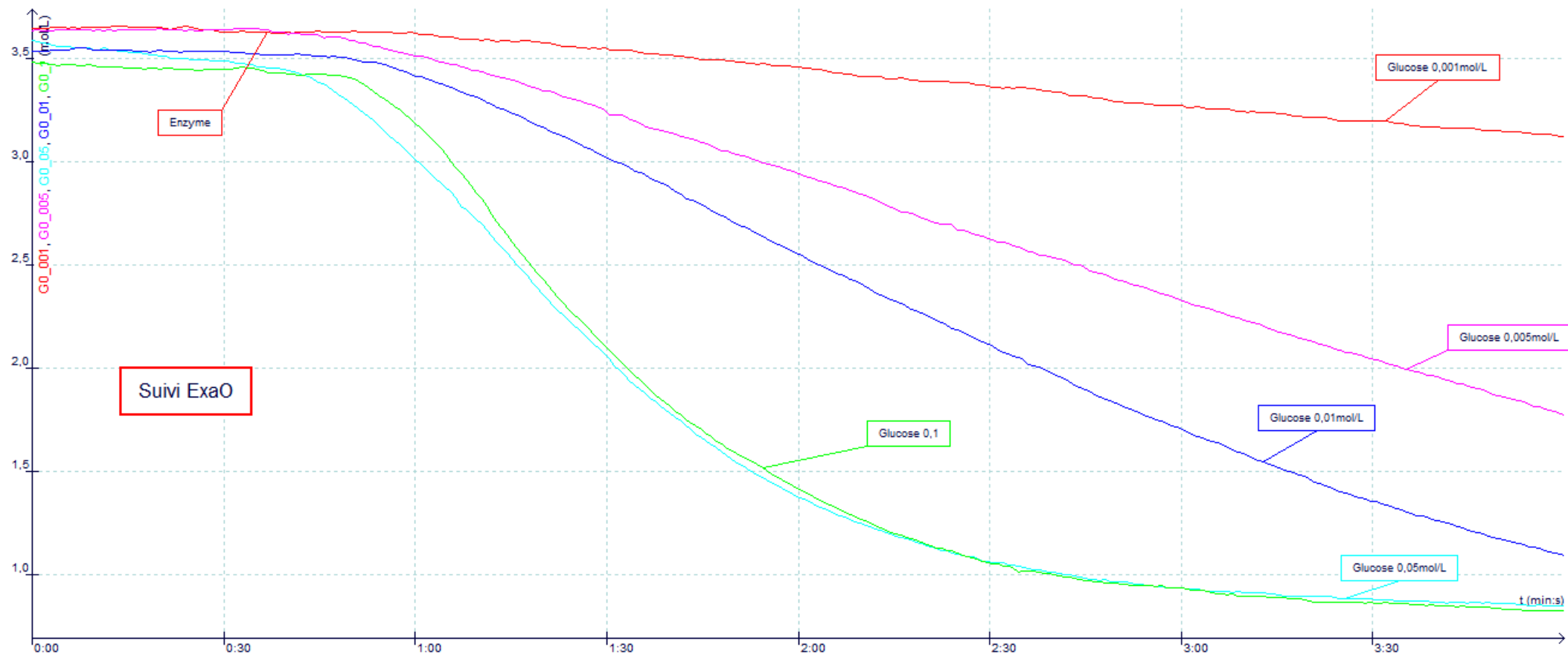
Mesure de la disparition du substrat par EXAO

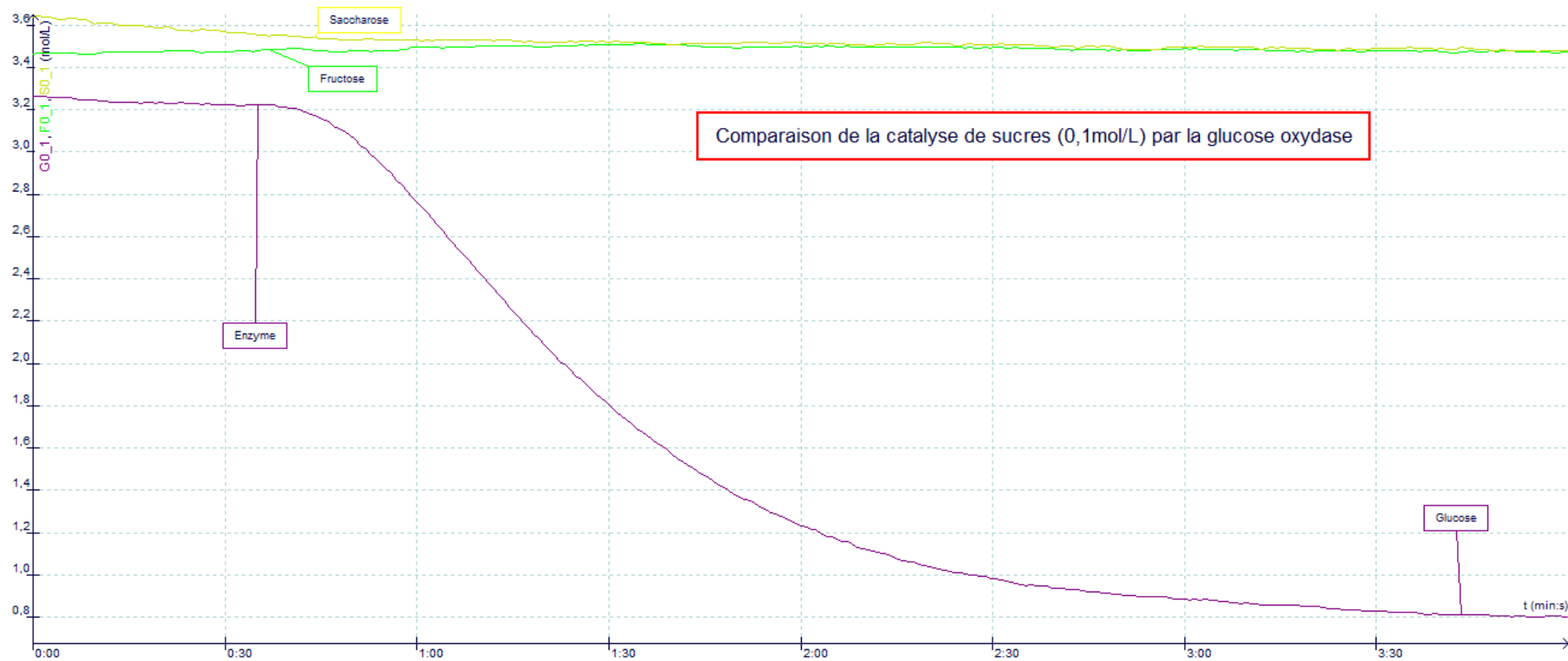


Effet de la concentration en glucose

Effet de la nature du substrat

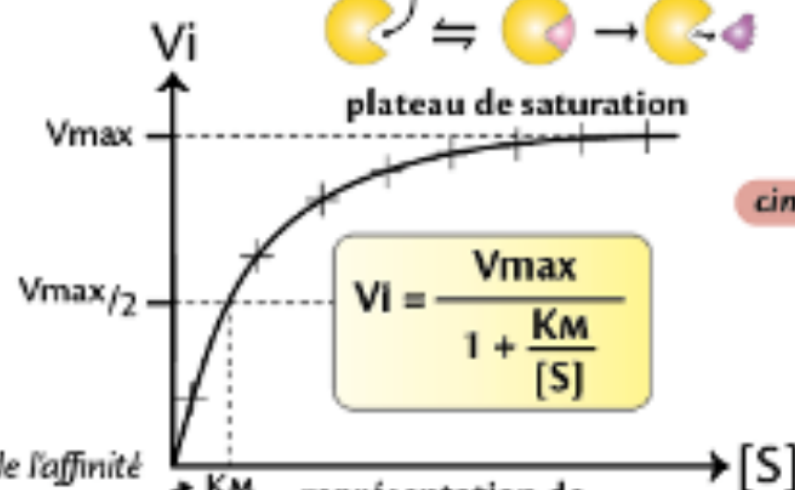
Effet du pH







plateau de saturation



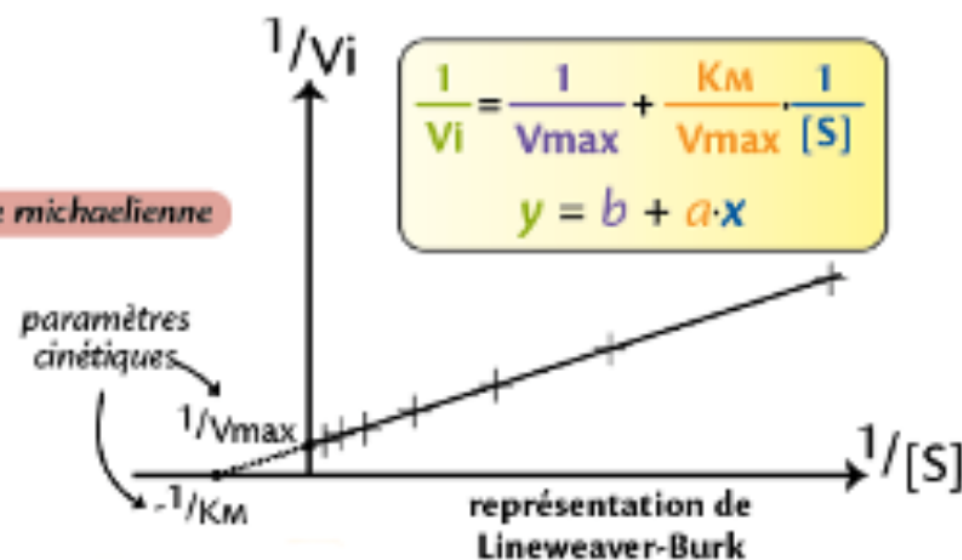
$$V_i = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

représentation de Michaelis-Menten

inverse de l'affinité
de l'enzyme
pour le substrat

K_M = constante de Michaelis

cinétique michaelienne

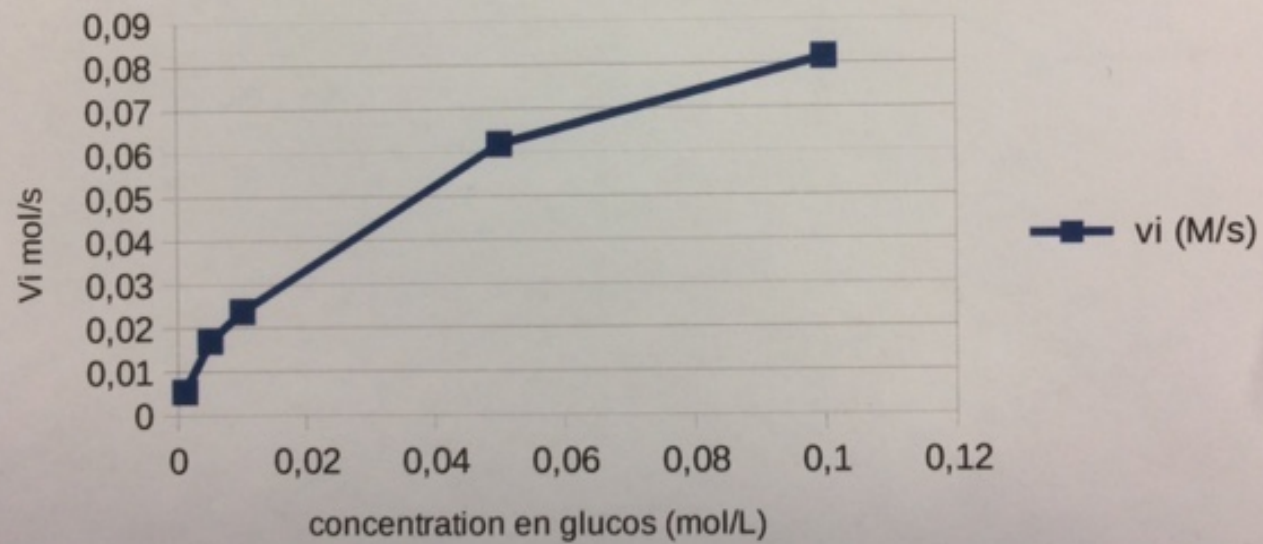


$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

$$y = b + a \cdot x$$

0,005	0,017	58,82352941	200	0
0,01	0,0238	42,01680672	100	0,5
0,05	0,062	16,12903226	20	7
0,1	0,0815	12,26993865	10	8

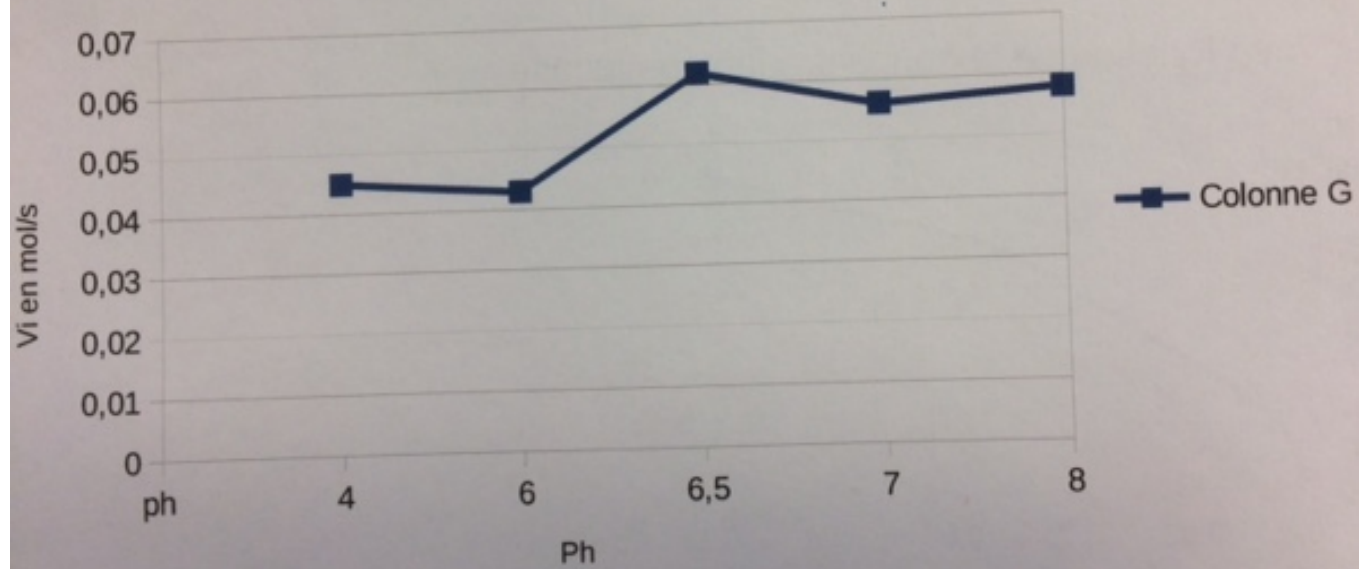
Vi en fonction de la concentration en glucose



strat	0,0815
ose	0,004
ose	0,0006
charose	

Vi en fonction du Ph

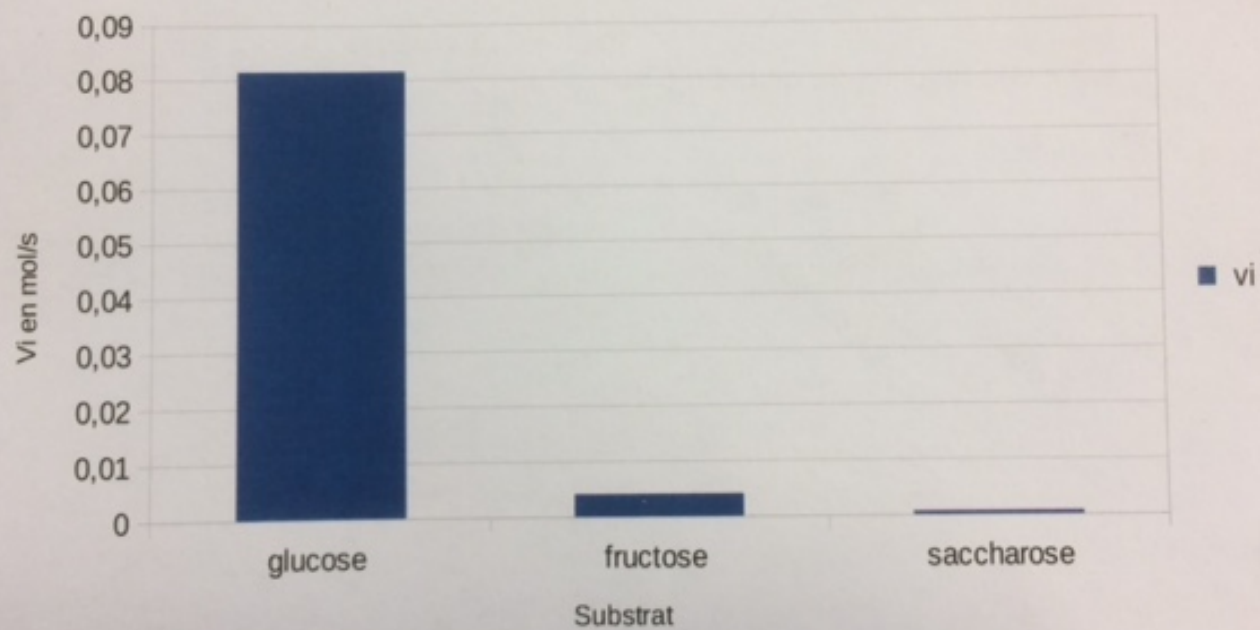
Réaction sur du glucose (0,1mol/L)



L'impact du glucose à 0,1mol/L

Ph

Histogramme des V_i en fonction du substrat sur une solution de glucose à 0,1mol/L



TOUJOURS représenter les données en DOUBLE INVERSE : $1/v_i = f(1/[S])$

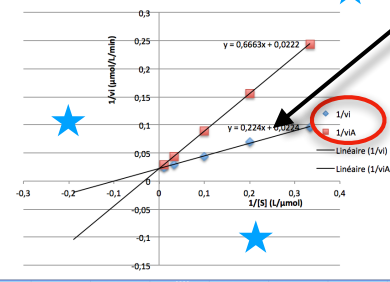
Bien organiser les données pour s'y retrouver

[S] (μmol/L)	1/[S]	v _i (μmol/L/min)	1/v _i	v _i (μmol/L/min)	1/v _{iA}
sans inhibiteur A					
3	0,33333333	10,4	0,09615385	4,1	0,24390244
5	0,2	14,5	0,06896552	6,4	0,15625
10	0,1	22,5	0,04444444	11,3	0,08849558
30	0,03333333	33,8	0,0295858	22,6	0,04424779
90	0,01111111	40,5	0,02469136	33,8	0,0295858

1/[S]	1/v _i	1/v _{iA}
0,33333333	0,096153846	0,24390244
0,2	0,068965517	0,15625
0,1	0,044444444	0,08849558
0,03333333	0,029585799	0,04424779
0,01111111	0,024691358	0,0295858

Copier/coller les valeurs en mettant les légendes en haut du tableau (permet d'avoir la légende des courbes)

Représentation de lineweaver et Burk



Format de courbe de tendance

Nom de la courbe de tendance
 Automatique : Linéaire (1/vi)
 Personnalisée :

Prévision
 Avancer : 0 Périodes
 Reculer : 0,2 Périodes

☐ Définir l'interception = 0

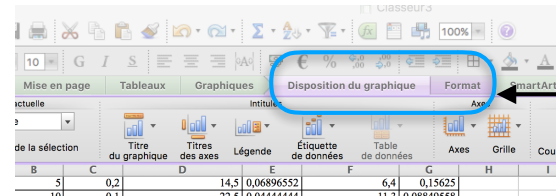
☒ Afficher l'équation sur le graphique

☒ Afficher le coefficient de détermination (R²) sur le graphique

Annuler OK

Prolonge la courbe de tendance vers les (x) négatifs

Equation de courbe : permet de déterminer $-1/K_M$. Valeur de x pour $y=0$



Donner un **titre** au graphique et des **légendes** aux axes. Cliquer sur la fenêtre du graphique, de nouvelles options apparaissent dans la barre menu.

Ne pas oublier les UNITES!

Particularités libre office : pour extrapoler la courbe de tendance : clic droit sur la courbe et choisir extrapoler vers l'arrière (en donnant une valeur positive).

Contrairement à Excel, suite à cette opération l'axe des abscisses n'est pas étendu automatiquement aux valeurs négatives. Il faut donc sélectionner l'axe des abscisses en cliquant dessus, puis clic droit et choisir formater l'axe des abscisses.

Calcul des écarts types

1- pour **chaque type de valeur**, on calcule la **moyenne** pour (exemple, la vitesse initiale moyenne pour une concentration donnée en substrat).

2 – pour **chaque point**, on calcule la **différence avec la moyenne** (*elle peut être négative ou positive*)

3 – pour chaque point, on prend le **carré de cette différence**
plus le point s'écarte de la moyenne, plus le carré différence est grand, et il est toujours positif

4 – on fait la **somme de ces carrés**
plus les points s'écartent de la moyenne, plus la somme des carrés est grande, mais elle dépend aussi du nombre de valeurs

5 – on **divise** la somme des carrés par la **taille de la population** → on obtient la **variance**
plus les points s'écartent de la moyenne, plus la variance est grande, indépendamment du nombre de valeurs étudiées

6 – on prend la **racine carré de la variance** → on obtient l'**écart-type**
plus les points s'écartent de la moyenne, plus l'écart-type est grand, indépendamment du nombre de valeurs. L'écart-type a la même unité que la variable étudiée.

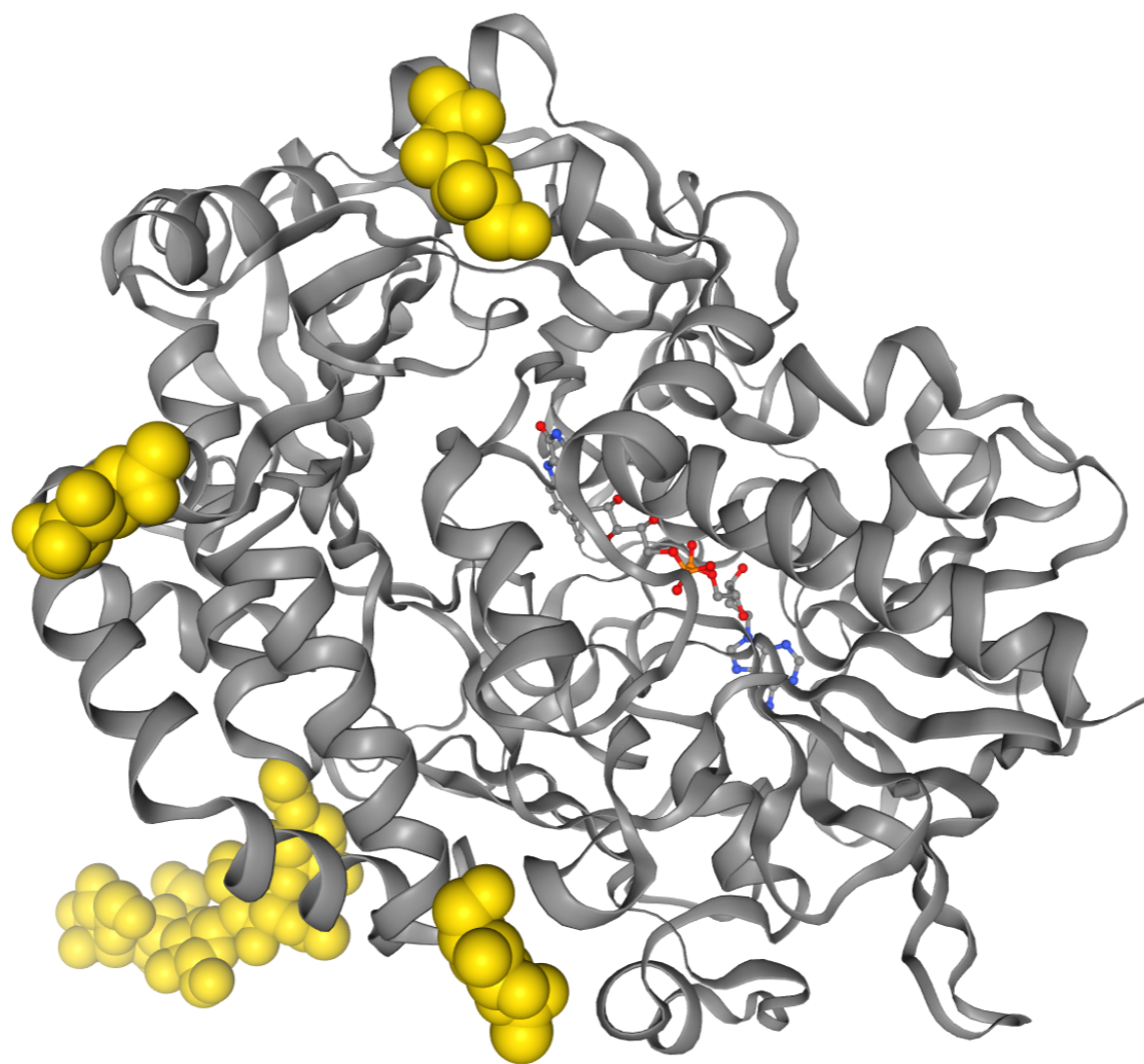
L'écart-type est donné par la formule :

$$\sigma = \sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 / n}$$

Réalisation d'une mesure :

- Remplir la cuve du bioréacteur avec la solution à tester ($V = 20\text{mL}$) à l'aide d'une seringue.
- Fermer le bioréacteur en faisant bien attention à ne pas laisser de bulle d'air à l'intérieur ; **insérer la sonde à O_2** dans le couvercle, sans tourner pour ne pas dévisser la tête de la sonde. La sonde doit ressortir de 1 ou 2 mm du bouchon. Veillez à ce **qu'aucune bulle** ne soit coincée sous la sonde lors des mesures. Mettre en route **l'agitateur magnétique**.
- **Préparer** une seringue contenant 0,4mL de glucose oxydase. Eliminer les éventuelles bulles d'air dans la seringue.
- Attendre la **stabilisation** de la sonde (mesure de concentration stable), puis lancer l'acquisition.
- 30 secondes plus tard, **injecter l'enzyme** en une seule fois. Cliquer sur  (annotation)
- A la fin des 4 minutes d'enregistrement (ou moins si la courbe est stable, soyez efficaces !) :
 - Donner un **nom** à la courbe avec l'outil Annotation
 - Déterminer la **pente de la tangente à l'origine** 
 - Indiquer le paramètre étudié en haut du graphe
 - **Enregistrer** les données avec un nom identifiable (initiales du groupe + exp.). Vous devez superposer les différentes courbes pour un même paramètre.
- Puis **laver** soigneusement la **cuve** du bioréacteur à l'évier (sans perdre l'agitateur), laver la **seringue** et le **bécher** et rincer le **couvercle** de la cuve avec la sonde avec la pissette d'eau distillée.

A la fin de chacune des 3 expériences, **imprimer** les courbes (courbes cumulées sur un seul graphique).



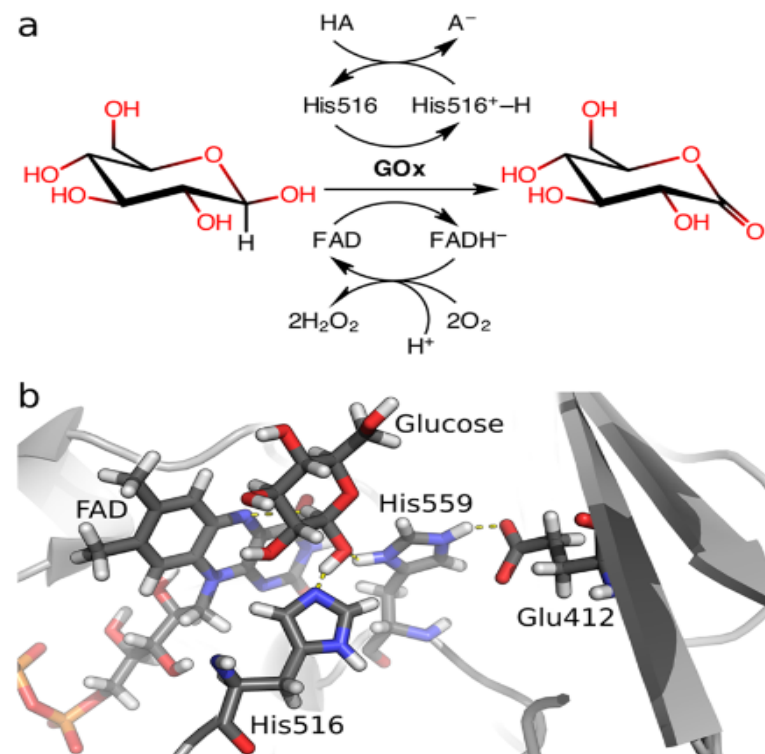


Figure 1. (a) In the reductive half-reaction, glucose binding is followed by concerted proton and hydride transfer from the C1 carbon of glucose to His516 and FAD, respectively. Electrons are then transferred, in the oxidative half-reaction, from reduced FAD to oxygen in two single-electron-transfer steps. (b) The active site of glucose oxidase from *A. niger* is buried in a pocket, and it is defined by Glu412, His516, His559, and FAD, which are shown as sticks, together with glucose, and colored by atom type (gray, C; blue, N; red, O; white, H; orange, P). The rest of the protein is shown in gray cartoon, and hydrogen bonds are indicated by dashed yellow lines.

S'ENTRAÎNER SUR LIBMOL : ETUDE DU MODELE MOLECULAIRE DE LA TRIOSE PHOSPHATE ISOMERASE

Sur le site <https://libmol.org/> :

- Fichier Libmol de la TPI sans substrat : <https://libmol.org/?pdb=4ZVJ>
 - Fichier Libmol de la TPI avec substrat DHAP : <https://libmol.org/?pdb=1NEY>
 - fichier Libmol de la TPI avec inhibiteur (PEP) : <https://libmol.org/?pdb=4OWG>
1. Avec le fichier TPI sans substrat : décrire la structure III de la TPI seule : conformation globale, type de structures II observées, taille, ...
 2. Avec le fichier TPI et son substrat :
 - a. faire apparaître l'enzyme et son substrat de 2 couleurs différentes e sous 2 représentations différentes (par exemple enzyme en rubans bleus / substrat en boules et bâtonnets jaunes).
 - b. Localiser le site actif et les résidus impliqués dans le site actif (menu Interactions), en particulier le glutamate 165 (résidu déterminant dans le mécanisme catalytique).
 3. Sur les 2 fichiers de la TPI avec et sans substrat : localiser les résidus 170 à 174 qui constituent la boucle 6 en les représentant d'une autre couleur que le reste de la protéine. Mettre en évidence l'ajustement induit.
 4. Avec le fichier TPI et son inhibiteur : localiser la zone de fixation de l'inhibiteur PEP sur la TPI. En déduire le mode d'action du PEP.