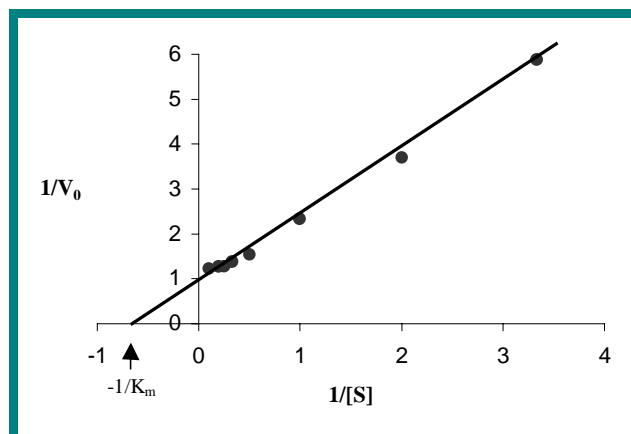


# RECUEIL D'EXERCICES DE BIOCHIMIE

## 5. Les enzymes

### 5.2. Dosage de l'activité enzymatique

### 5.3. $K_m$ et $V_{max}$



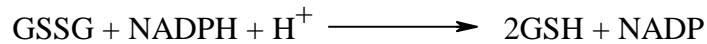
Université du Québec à  
Montréal

## 5.2. Dosage de l'activité enzymatique

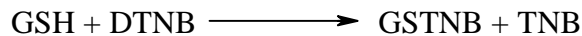
### 5-8 : Dosage de l'activité de la glutathione réductase.

#### Énoncé :

La glutathione réductase catalyse la réaction suivante :



La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de 5,5'-dithiobis(2-acide nitrobenzoïque) (DTNB) :



Le TNB absorbe à 412 nm ( $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) et permet de quantifier l'activité de la glutathione réductase. Ainsi, pour chaque molécule de GSH formée, il y aura formation d'une molécule de TNB.

Vous voulez déterminer l'activité de la glutathione réductase dans un extrait végétal. Vous préparez le milieu de dosage de la façon suivante :

- 1,0 mL de tampon  $\text{KPO}_4$  à pH 7,5 (0,2 M)
- 0,5 mL de DTNB (3 mM)
- 0,1 mL de  $\text{NADPH}_2$  (2 mM)
- 0,1 mL d'extrait végétal
- 0,2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$
- 0,1 mL de GSSG (2 mM)

La réaction débute avec l'ajout de GSSG et vous prenez l'absorbance à toutes les minutes pendant 5 minutes à 412 nm. Vous obtenez les résultats suivants :

Temps (min)	Absorbance à 412 nm
1	0,184
2	0,394
3	0,606
4	0,816
5	1,024

#### Question :

Déterminez l'activité de la glutathione réductase en nmol de GSH produit/min/mg protéine. Un dosage des protéines vous indique qu'il y a 1,8 mg de protéine par mL d'extrait végétal.

#### Réponse

### 5.3. $K_m$ et $V_{max}$

#### 5-9 : Estimation de $V_{max}$ et de $K_m$ par inspection.

##### Énoncé : Voir

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. *Principes de biochimie*. Deuxième Édition. Traduction française de : Biochemistry. Second Edition. Worth Publishers. New York. 1993. p. 238 #6.

ou

Charles Bilodeau. *Recueil d'exercices de biochimie*. Département des Sciences biologiques. UQAM. 1999. p. 43. (COOP)

[Réponse](#)

#### 5-10 : Réaction de transamination.

##### Énoncé : Voir

Lehninger, A. L. *Biochimie*. Deuxième Édition. Traduction française de : Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function. 6<sup>th</sup> Edition. Worth Publishers. New York. 1970. p. 166 #5.

ou

Charles Bilodeau. *Recueil d'exercices de biochimie*. Département des Sciences biologiques. UQAM. 1999. p. 43. (COOP)

[Réponse](#)

**5-8 :**

1°: Déterminer la concentration en GSH à chacun des temps, à partir de  $\epsilon$ .

À 1 min :

$$A = \epsilon c l$$

$$0,184 = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times c \times 1 \text{ cm}$$

$$c = 0,184/13,6 \text{ mM}^{-1}$$

$$c = 0,0135 \text{ mM ou } 13,5 \text{ } \mu\text{M}$$

Temps (min)	[GSH] ( $\mu\text{M}$ )
1	13,5
2	29,0
3	44,6
4	60,0
5	75,3

2° : Déterminer la formation moyenne de GSH par minute.

Intervalle de temps (min)	[GSH] ( $\mu\text{M}$ )
1-2	15,5
2-3	15,6
3-4	15,4
4-5	15,3

Moyenne = 15,5  $\mu\text{M}$

Donc nous avons 15,5  $\mu\text{M}$  de GSH de produit/min

3° : Exprimer en nmol de GSH produit/min/mg de protéine

$$15,5 \text{ } \mu\text{M}/\text{min} = 15,5 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}/\text{min}$$

*Le volume final de dosage est de 2 mL (0,002 L)*

Donc,

$$15,5 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}/\text{min} \times 0,002 \text{ L}/\text{mL} = 0,031 \text{ } \mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min} \text{ ou } 31 \text{ nmol}/\text{mL}/\text{min}$$

### Nous avons un extrait de 0,1 mL

Donc pour 1 mL d'extrait,

31 nmol/mL/min X 10 = 310 nmol/min/mL d'extrait végétal

1 ml d'extrait contient 1,8 mg de protéine

Donc,

310 nmol/min/1,8 mg de protéine = 172 nmol de GSH produit/min/mg de protéine

#### 5-9 :

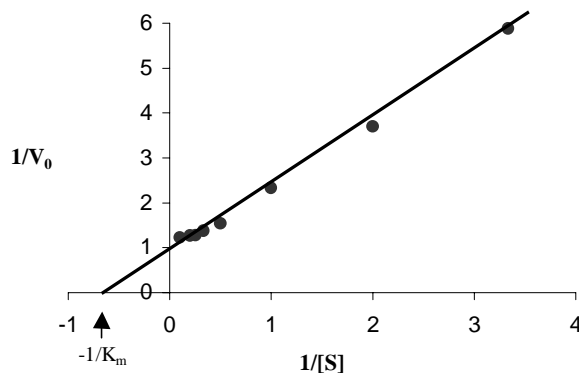
En examinant les deux dernières concentrations de substrats utilisées, on voit que  $V_0$  n'augmente presque plus. On peut donc estimer  $V_{\max}$  à près de 140  $\mu\text{M}/\text{min}$ .

$$K_m = \frac{V_{\max}}{2} = \frac{140 \mu\text{M}/\text{min}}{2} = 70 \mu\text{M}/\text{min}$$

Donc à 70  $\mu\text{M}/\text{min}$ ,  $[\text{S}] = 10^{-5} \text{ M} = K_m$

#### 5-10 :

Il faut calculer  $1/V_0$  et  $1/[\text{S}]$  et tracer le graphique de Lineweaver-Burk.



Par régression linéaire, on peut trouver l'intercept pour  $x = 0$  ( $1/[\text{S}] = 0$ ), on obtient -0,631.

$$-0,631 = -1/K_m.$$

Donc  $K_m = 1,58 \mu\text{M}$