

Thème 5 – Chapitre 3 – Activité 2

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ β -LACTAMASE DE L'ALBUMINE

Éléments de réponse



1. MESURE DE L'ACTIVITÉ β -LACTAMASE DE L'ALBUMINE

1.1.

Seul, le produit présente une absorbance à 500 nm. On suit la vitesse de la réaction catalysée par l'albumine en mesurant l'augmentation de l'absorbance due au P à λ_{max} de 500 nm.

1.2.1.

$$C_{substrat} = 0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$$

1.2.2.

La vitesse initiale est mesurée pendant la phase linéaire. En prenant 2 points dans cette phase, on trouve $V_i = \frac{\Delta C}{\Delta t} = 0,04 \text{ mmol.L}^{-1}.s^{-1} = 2,4 \text{ mmol.L}^{-1}.min^{-1}$

Pour exprimer la vitesse en mmol.min^{-1} , il est nécessaire de multiplier le résultat obtenu par le volume réactionnel (2,5 mL) : $V_i = 6 \cdot 10^{-3} \text{ mmol.min}^{-1}$

La température influence la vitesse de la réaction enzymatique. Si la température du milieu diminue, l'agitation moléculaire diminue, la vitesse de la réaction enzymatique diminue.

1.2.3.

Il est nécessaire d'avoir deux points dans la phase linéaire, en général, on prépare un blanc qui sert de t_0 et un autre point t .

Protocole :

- t : Essai : introduire dans une cuve dans cet ordre :

- . 1,9 mL de tampon tris pH 7,4 préincubé à 37 °C ;
- . 0,1 mL de S à 1,25 mmol.L⁻¹ préincubé à 37 °C ;
- . 0,5 mL d'E à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$;
- . incuber à 37 °C pendant un temps exactement ≤ 2 min (pour être encore en phase linéaire) ;
- . il est nécessaire d'arrêter la réaction rapidement par exemple par ajout d'une base forte qui modifiera le pH.

- t_0 : Introduire dans une cuve dans cet ordre :

- . 1,9 mL de tampon tris pH 7,4 ;
- . 0,1 mL de S à 1,25 mmol.L⁻¹ ;
- . volume de solution d'arrêt (avant addition de E)
- . 0,5 mL d'E à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Remarque : dans ce protocole, on néglige tout phénomène d'hydrolyse spontanée du substrat.

1.3.1.

V_{max} : tangente de l'asymptote = 8,1 $\text{mmol.L}^{-1}.min^{-1}$

K_m lu sur le graphique pour $V_{max}/2$ $K_m = 0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$

1.3.2.

$$z_m = \frac{V_{max} \times V_{milieu \text{ r actionnel}}}{n_{enzyme}} = \frac{8,1 \times 2,5 \cdot 10^{-3}}{0,025} = 0,810 \text{ mmol}_{substrat} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{mol}_{enzyme}^{-1}$$

avec $n_E = C_E \cdot V_E = 50 \mu\text{mol.L}^{-1} \times 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 0,025 \mu\text{mol}$

2. ALBUMINE, β -LACTAMINES ET POLLUANT DANS LE SANG

2.1.1.

Cf. cours p. 300.

2.1.2.

$$\frac{1}{V'_{\max}} = 0,12 \text{ L} \cdot \text{min} \cdot \text{mmol}^{-1} \text{ donc } V'_{\max} = 8,3 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$-\frac{1}{K'_M} = -32 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \text{ donc } K'_M = 0,031 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

2.2.

	V'_{\max} (mmol·min ⁻¹ ·L ⁻¹)	K'_M (mmol·L ⁻¹)	z_M (mmol _{substrat} ·min ⁻¹ ·μmol _{enzyme} ⁻¹)
Sans naphtol	8,1	0,08	0,810
Avec naphtol	8,3	0,031	0,820

La vitesse maximale augmente légèrement en présence de naphtol-1. Le K'_M diminue fortement, l'affinité de l'enzyme pour son substrat est plus importante en présence de naphtol. L'activité spécifique molaire augmente très légèrement en présence de naphtol.

Le naphtol est donc un activateur.

2.3.

Au niveau de l'albumine, le naphtol entraîne une modification de la structure secondaire. En effet une nouvelle hélice alpha apparaît. La structure tertiaire au niveau du site actif est donc modifiée. Les interactions avec le substrat sont donc plus efficaces et l'affinité de l'enzyme pour son substrat augmente.

3. ALBUMINE ET RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Bien qu'ayant un K'_M similaire à l'albumine, la β -lactamase bactérienne a une activité spécifique bien plus importante que l'activité β -lactamase de l'albumine. Elle est donc beaucoup plus rapide. Bien qu'existe l'activité β -lactamase de l'albumine est négligeable.