

# **TRAVAUX DIRIGES D'ENZYMOLOGIE**

## **S4-SV**

### **ANNEE UNIVERSITAIRE 2014/2015**

**TD N°1 : Vitesse initiale - L'équation de Michaelis-Menten - Paramètres cinétiques :  $V_{\max}$ ,  $K_M$ ,  $k_{\text{cat}}$**

**TD N°2 : Inhibition compétitive, non compétitive et incompétitive. Effets de la  $T^\circ$  et du pH**

**TD N°3 : Réactions enzymatiques à deux substrats et exemple d'allostérie**

**Responsable du Cours Magistral : Pr M. BENICHO**

**Intervenants aux Travaux Dirigés : Mme M. CHEGGOUR**

**Mme M. SAGAR**

## TD N°1 Enzymologie

Vitesse initiale - L'équation de Michaelis-Menten - Paramètres cinétiques :  $V_{\max}$ ,  $K_M$ ,  $k_{\text{cat}}$

### Exercice N°1

Une enzyme E catalyse la réaction d'hydrolyse:  $A + H_2O \rightleftharpoons B + C$

On suit la cinétique d'apparition du produit C, pour différentes concentrations en substrat A.

Les valeurs obtenues (en  $\mu\text{moles}$  de C par tube) sont présentées dans le tableau suivant:

Temps (min)	[S0] (mM)			
	10	30	100	150
0	0	0	0	0
2,5	0,9	1,9	3,2	3,6
5	1,8	3,9	6,4	7,1
7,5	2,5	5,6	9,6	10,7
12,5	3,7	7,6	15,2	17,6
17,5	4,4	9,1	18,3	

1. Représentez les cinétiques et déterminez la vitesse initiale de chacune d'elle.  
Dans quelle condition de concentration du substrat A s'est-on placé pour suivre ces cinétiques?

Pourquoi ne se préoccupe-t-on pas de la concentration de l'eau ?

2. Tracez la courbe de saturation et commentez la.

Déterminez les paramètres cinétiques de l'enzyme à partir de cette représentation.

3. Déterminez les paramètres cinétiques à l'aide de la représentation des double inverses.

Expliquez la différence entre les valeurs déterminées à partir de ces deux

représentations.

4. Les réactions enzymatiques sont effectuées dans un tube contenant 1 ml de la solution d'enzyme à une concentration initiale de 3  $\mu\text{M}$ , le volume réactionnel étant complété par 2 ml de substrat dans le tampon approprié.

Calculez les valeurs des paramètres cinétiques (exprimez la concentration en molarité).

5. Une unité d'enzyme (U) est la quantité qui hydrolyse 1  $\mu\text{mole}$  de substrat par minute. Par ailleurs, l'activité spécifique d'une enzyme est le rapport de l'activité maximale de l'enzyme à sa concentration (exprimée en  $\text{mg/ml}$ ) dans le milieu réactionnel. Enfin, la masse molaire de l'enzyme E est de 100.000 dalton. Calculez l'activité spécifique en  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

6. On considère que l'enzyme a été totalement purifiée. Calculez la valeur de la constante catalytique ( $k_{\text{cat}}$ ) en  $\text{s}^{-1}$ .

7. Si l'enzyme E est une enzyme dite "Michaelienne", à quelle constante du schéma réactionnel classique pour une telle enzyme correspond cette constante ? Expliquez-en les unités.

Retrouvez les unités de  $K_m$  sur la base de celles des constantes de vitesse  $k_1$ ,  $k_{-1}$  et  $k_2$ .

## Exercice N°2

L'étude préliminaire de l'activité de deux enzymes (E1 et E2) vis-à-vis du même substrat donne les résultats suivants:

[S0] (mM)	1	2	3	4	5
E1 $v_i$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,040	0,078	0,124	0,160	0,205
E2 $v_i$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,270	0,280	0, 275	0,280	0,285

Tracez la courbe  $v_i = f([S0])$ . Quelles conclusions pouvez-vous en tirer ?

## Exercice N°3

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des esters de l'acide ortho-phosphorique. Pour suivre l'activité enzymatique, on utilise un substrat synthétique, le paranitrophénol-phosphate (M. M. = 371  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) qui libère du paranitrophénol (M. M. = 139  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) qui absorbe à 410 nm avec un coefficient d'extinction pondéral:  $\epsilon^{1\%} = 1260 \text{ g}^{-1}\cdot 100 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Chaque réaction est effectuée dans un volume réactionnel de 10 ml contenant 0,2 ml d'enzyme à une concentration initiale de 10  $\text{mg/ml}$ . On obtient les résultats suivants (longueur du trajet optique = 1 cm):

[S0] (mg/tube)	0	0,26	0,39	0,65	1,50	1,95	3,80
vi (U. DO.min <sup>-1</sup> )	0	0,147	0,167	0,190	0,212	0,231	0,238

Déterminez les valeurs des paramètres cinétiques de cette enzyme vis-à-vis de ce substrat (on exprimera la concentration en molarité).

Calculez l'activité spécifique de l'enzyme avec l'unité de concentration précisée dans l'exercice N°1.

### Exercice N°4

D'une part, on a purifié une isomérase. D'autre part, on a cloné la séquence codant cette isomérase dans un vecteur d'expression et transformé des bactéries. On a fait une culture de ces bactéries et induit la synthèse protéique. Enfin, de l'extrait brut bactérien obtenu, une enzyme recombinante a été purifiée que l'on appelle l'enzyme inconnue ( $E_{inc}$ ).

On étudie la réaction d'isomérisation d'un substrat S en un produit P, en présence:

- 1ère expérience: de l'isomérase seule
- 2ème expérience: de l'isomérase ET de l'enzyme inconnue

Pour chaque expérience, on mesure la vitesse initiale de la réaction (exprimée en nM.s<sup>-1</sup>) pour différentes concentrations [S0] du substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

[S <sub>0</sub> ] (μM)	vi (nM.s <sup>-1</sup> )	
	1ère expérience: [Isomérase] = 10 pM	2è expérience: [Isomérase] = 10 pM + [E <sub>inc</sub> ] = 10 pM
0,2	1,2	2,4
0,4	1,6	3,2
1	2,1	4,2
2	2,3	4,6

1. Pour chaque expérience, déterminez les paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_M$ , à partir de la représentation graphique de votre choix.

2. Calculez la valeur de la constante catalytique de l'isomérase ( $k_{cat_{Iso}}$ ).

On a déterminé la constante catalytique de l'enzyme inconnue:  $k_{cat_{Einc}} = 15360 \text{ min}^{-1}$ .

3. Un seul paramètre cinétique diffère entre les 2 expériences (d'un facteur 2). Lequel

et pourquoi ?

4. En conclusion, l'enzyme inconnue dont le gène a été cloné est-elle bien l'isomérase ?

## TD N°2 Enzymologie

Inhibition compétitive, non compétitive et incompétitive

### Exercice N°1

On suit la cinétique d'hydrolyse de l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) par la  $\beta$ -galactosidase, respectivement en absence d'inhibiteur et en présence d'orthonitrophényl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (ONPTG), de maltose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranose) ou de mélibiose ( $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1,6)- $\alpha$ -D-glucopyranose).

Voir un cours sur les oses.

Les valeurs des vitesses initiales obtenues en suivant la variation de l'absorbance à  $\lambda = 410$  nm sont les suivantes :

[S <sub>0</sub> ] (M)	v <sub>i</sub> ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ )			
	Sans I	[ONPTG] $3 \cdot 10^{-4}$ M	[maltose] 0,26 M	[mélibiose] 0,17 M
0	0	0	0	0
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,033	0,018	0,016	0,027
$5 \cdot 10^{-5}$	0,055	0,033	0,027	0,041
$1 \cdot 10^{-4}$	0,082	0,055	0,041	0,055
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,118	0,091	0,059	0,069
$5 \cdot 10^{-4}$	0,138	0,118	0,069	0,075
$1 \cdot 10^{-3}$	0,150	0,138	0,075	0,079

1. Déterminez  $V_{\max}$ ,  $K_M$  et  $k_{\text{cat}}$  (en  $\text{s}^{-1}$ ) à l'aide de la représentation de votre choix.
2. Déterminez les paramètres cinétiques  $V_{\max}^{\text{app}}$  et  $K_M^{\text{app}}$  en présence des inhibiteurs.

Calculez les constantes  $K_I$ .

3. Que suit-on à  $\lambda = 410 \text{ nm}$  ?

4. Expliquez le type d'inhibition observé pour chacun des inhibiteurs de cet exercice.

Données:  $[E_0] = 1,19 \cdot 10^{-9} \text{ M}$  -  $\epsilon_M^{\text{ONP}} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  -  $l = 1 \text{ cm}$

Exercice N°2

L'étude préliminaire de l'activité d'une enzyme en absence et en présence d'un inhibiteur donne les résultats suivants :

$[S_0]$ (mM)	1	2	4	7	10
$v_i$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ ) sans I	31	33	34,5	36	37
$v_i$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ ) avec I	19	21	22,5	24	25

1. Tracez les courbes de saturation. Quelles conclusions pouvez-vous en tirer ?

2. Dans le cas d'un inhibiteur incompétitif, dans quelle partie de la courbe de saturation (en d'autres termes, pour quelle gamme de concentrations de substrat), cet inhibiteur est-il le plus efficace ?

Exercice N°3

On dispose d'une molécule M dont on veut préciser le rôle dans une réaction catalysée par une enzyme :  $\text{Substrat} + \text{M} \text{ -----} \rightarrow \text{produit(s)}$

On mesure la vitesse initiale de cette réaction (exprimée en  $\text{nM} \cdot \text{min}^{-1}$ ) pour différentes concentrations de S, en présence ou non de la molécule M (à la concentration indiquée dans le tableau suivant).

$[S_0]$ ( $\mu\text{M}$ )	[molécule M] (mM)		
	0	1	2,84
1	3,8	2,7	1,7
2	6	4,2	2,6
5	9	6,2	4,1
10	10,5	7,7	4,8

D'après les résultats de ce tableau, déterminez si la molécule M est :

- un second substrat : dans ce cas, tracez les graphes primaires, déterminez les paramètres cinétiques auxquels vous avez accès et précisez le type de mécanisme réactionnel.

- un inhibiteur : dans ce cas, déterminez le type d'inhibition et calculez la valeur de la constante  $K_I$ .

Exercice N°4

Une enzyme catalyse l'isomérisation d'une double liaison d'un acide gras insaturé en C16.

On étudie la réaction catalysée par cette enzyme, en absence et en présence d'un inhibiteur I.

On suit la réaction enzymatique en mesurant la variation d'absorbance due à l'apparition du produit.

Pour différentes concentrations en substrat, on obtient les vitesses initiales suivantes (U.A. = unité d'absorbance) :

[C16] <sub>0</sub> (mM)	vi (U.A.h <sup>-1</sup> ) [I] = 55 μM	vi (U.A.h <sup>-1</sup> )
0,8	0,5	0,8
1,2	0,7	1,1
1,9	1,1	1,5
2,4	1,2	1,7
3,4	1,5	2,0
5,8	2,0	2,6
8,7	2,4	2,9

- Déterminez les paramètres cinétiques ( $V_{max}$ ,  $K_M$  et  $k_{cat}$ ) et les paramètres cinétiques en présence de l'inhibiteur, par une méthode graphique de votre choix.

Les concentrations doivent être exprimées en molarité.

- Précisez le type d'inhibition et calculez la constante d'inhibition  $K_I$ .

Données :  $[E]_0 = 9 \mu\text{M}$  -  $\epsilon_M^{\text{produit}} = 17000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  -  $l = 1 \text{ cm}$

## TD N°3 Enzymologie

- Réactions enzymatiques à deux substrats

### Exercice N°1

Une enzyme catalyse une réaction selon un mécanisme ordonné.

On mesure la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations de l'un des substrats (X) en maintenant fixe la concentration de l'autre substrat (Y), et inversement.

Les résultats, exprimés en  $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ , sont les suivants :

[X] (mM)	[Y] (μM)		
	3	5	10

0,33	0,017	0,025	0,039
0,67	0,024	0,033	0,038
5	0,034	0,047	0,061

1. En n'utilisant que les deux représentations primaires, déterminer les paramètres cinétiques auxquels vous avez accès.
2. En déduire l'ordre de fixation des substrats. Quel paramètre cinétique n'est pas déterminé ?

## Exercice N°2

La phospholipase A2 catalyse l'hydrolyse de l'acide gras estérifié en position 2 des 1-2-diacylphosphoglycérides en présence d'ion calcium.

On mesure les vitesses initiales d'hydrolyse de la dibutyryl-lécithine (DBL), à différentes concentrations de ce substrat et de calcium.

La réaction est suivie en titrant l'acide libéré par la soude et les résultats, en  $\mu\text{moles d'acide libéré} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de phospholipase, sont les suivants :

[DBL] (mM)	[Ca <sup>2+</sup> ] x 10 <sup>6</sup> (M)			
	25	50	100	200
11,4	0,60	0,83	1,00	1,15
22,7	1,07	1,40	1,70	1,85
34	1,45	1,85	2,15	2,35
45,4	1,75	2,20	2,50	2,70

1. Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction.
2. On étudie l'effet de l'acide butyrique (analogue de la DBL) et du baryum (analogue du calcium).

L'acide butyrique se comporte comme un inhibiteur compétitif de la DBL et comme un inhibiteur un-compétitif du calcium. Le baryum se comporte comme un inhibiteur compétitif du calcium et de la DBL. Ces résultats sont-ils en accord avec le précédent ?

## Exercice N°3

On étudie le mécanisme catalytique de la glycogène phosphorylase en mesurant les vitesses initiales de la réaction pour différentes concentrations des 2 substrats (le glycogène et le phosphate).

Les résultats, en  $\mu\text{moles de glucose 1-phosphate} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  glycogène phosphorylase, sont les suivants :

[phosphate] x	[glycogène] (mg.mL <sup>-1</sup> )
---------------	------------------------------------



$10^3(M)$	3,2	8	16	24	48
6	12	18	21	23	25
15	24	35,5	43	46	49
30	35,5	53	64	68,5	74
45	43	64	77	82	88
60	47,5	71	85	91,5	98,5

Écrire la réaction catalysée.

Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction.

### Exercice N°4

Une protéine kinase catalyse la réaction 1 : protéine substrat (inactive) + ATP -----  
> protéine substrat phosphorylée + ADP)

La protéine substrat phosphorylée catalyse à son tour la réaction 2 : lipide Cn:0 + malonyl-CoA -----> lipide Cn+2:0

Le mécanisme de la réaction 2 est ordonné.

On mesure la vitesse initiale de la réaction 2 pour différentes concentrations des 2 substrats lipide Cn:0 et malonyl-CoA.

Les résultats, exprimés en  $\mu M \cdot \text{min}^{-1}$ , sont les suivants :

lipide Cn:0 (mM)	[malonyl-CoA] ( $\mu M$ )		
	0,33	0,67	5
3	0,017	0,024	0,034
5	0,025	0,033	0,047
10	0,039	0,038	0,061

1. Déterminer les paramètres cinétiques auxquels on a accès en n'utilisant que les deux représentations primaires.
2. Déterminer l'ordre de fixation des substrats.
3. De quel paramètre cinétique ne détermine-t-on pas la valeur ?

### Exercice N°5

La galactose-1-phosphate uridylyltransférase catalyse la réaction : UDP-glucose + galactose-1-phosphate <=====> UDP-galactose + glucose-1-phosphate

Le mécanisme de la réaction 2 est ordonné.

On mesure la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations des 2

substrats UDP-glucose et galactose-1-phosphate.

Les résultats, exprimés en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , sont les suivants :

[UDP-glucose] ( $10^{-3}$ M)	[galactose-1-phosphate] ( $10^{-3}$ M)			
	0,06	0,12	0,25	0,50
0,05	0,034	0,048	0,061	0,069
0,10	0,041	0,063	0,087	0,105
0,20	0,046	0,075	0,111	0,143
0,50	0,050	0,085	0,133	0,182

1. Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction.

On étudie l'effet inhibiteur des produits de cette réaction, c'est-à-dire l'inhibition par le glucose-1-P (figures A et B, ci-dessous) et l'inhibition par l'UDP-galactose (figures C et D, ci-dessous).

2. Les résultats sont-ils en accord avec le mécanisme déterminé ?

3. Quelle information supplémentaire apportent-ils ?

4. Proposer un schéma réactionnel compatible avec ces résultats

Figure  
s ci-  
contre  
:  
inhibi  
tion  
par le  
glucos  
e-1-P.

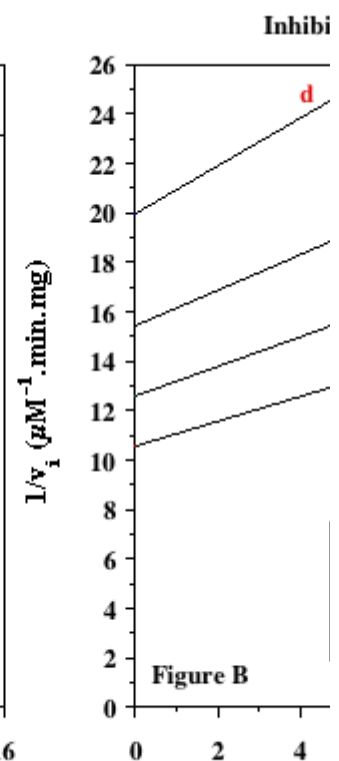
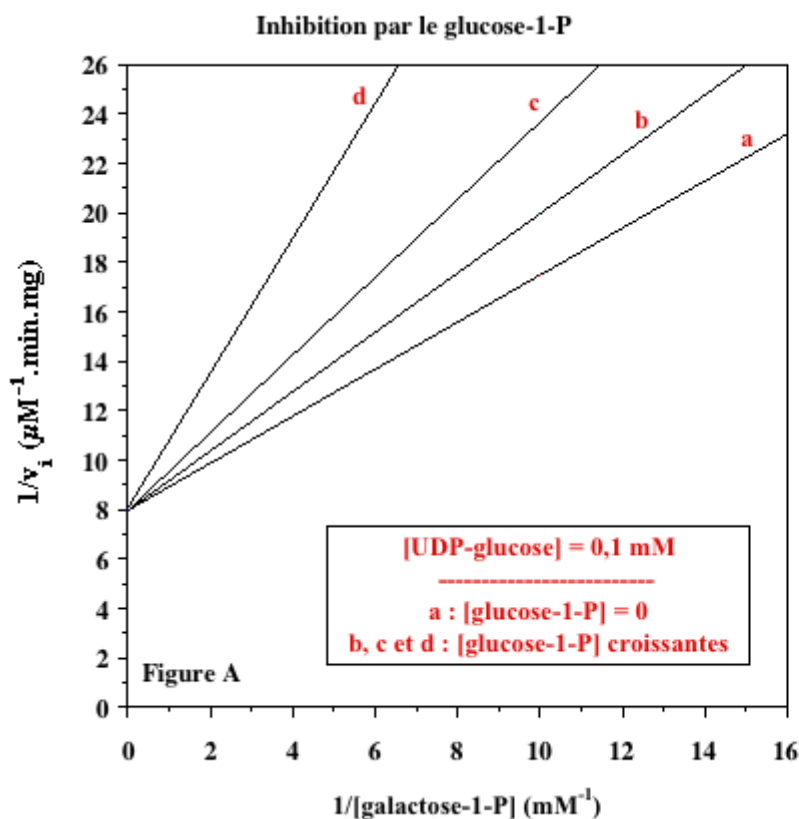


Figure  
s ci-  
contre  
: inhibi  
tion  
par  
l'UDP  
-  
galact  
ose.

