

Enzymologie

On étudie la cinétique de l'enzyme thréonine déshydratase ou L-thréonine hydro-lyase (E.C.4.2.1.16) d'*E. Coli*. Cette enzyme catalysant la transformation de la [L-thréonine](#) (4 carbones) en acide 2-oxobutyrique (4 carbones) + ammoniac (désamination), est la première enzyme spécifique de la biosynthèse de l'[isoleucine](#).

| Concentration en substrat (M) | Vitesse initiale (mole/min/ml d'enzyme) |
|-------------------------------|---|
| 0,00100 | 0,000125 |
| 0,00125 | 0,000150 |
| 0,00167 | 0,000177 |
| 0,00250 | 0,000228 |
| 0,00500 | 0,000315 |

L'action de deux inhibiteurs sur l'enzyme a été étudiée. Elle concerne **D-allothréonine** (isomère de L-thréonine) et L-isoleucine (produit final de la voie métabolique). Les vitesses initiales de l'enzyme obtenues avec L-thréonine en présence de chacun des deux inhibiteurs sont présentées dans le tableau:

| L-thréonine (M) | Vitesse initiale en présence de D-allothréonine (0,01 M) en mole/min/ml d'enzyme (10^{-4}) | Vitesse initiale en présence de L-isoleucine (0,001 M) en mole/min/ml d'enzyme (10^{-5}) |
|-----------------|--|--|
| 0,00100 | 0,62 | 3,87 |
| 0,00125 | 0,74 | 4,54 |
| 0,00167 | 0,95 | 5,50 |
| 0,00250 | 1,30 | 7,06 |
| 0,00500 | 2,00 | 9,60 |

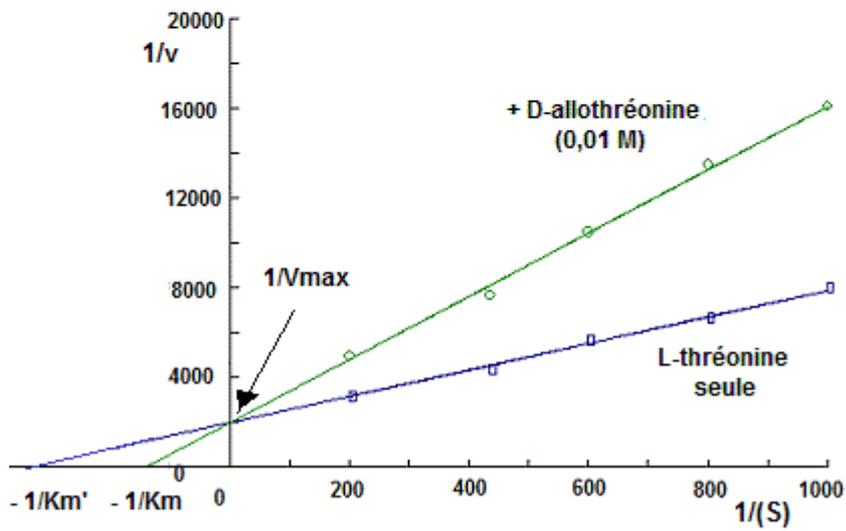
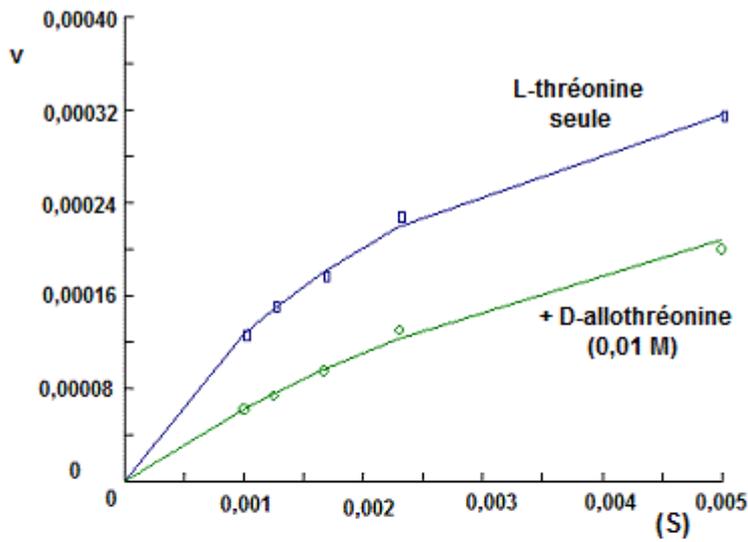
1/ Calculer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme pour son substrat utilisé en absence et en présence de chacun des deux inhibiteurs.

2/ Déterminer le type d'inhibition exercée par les deux inhibiteurs.

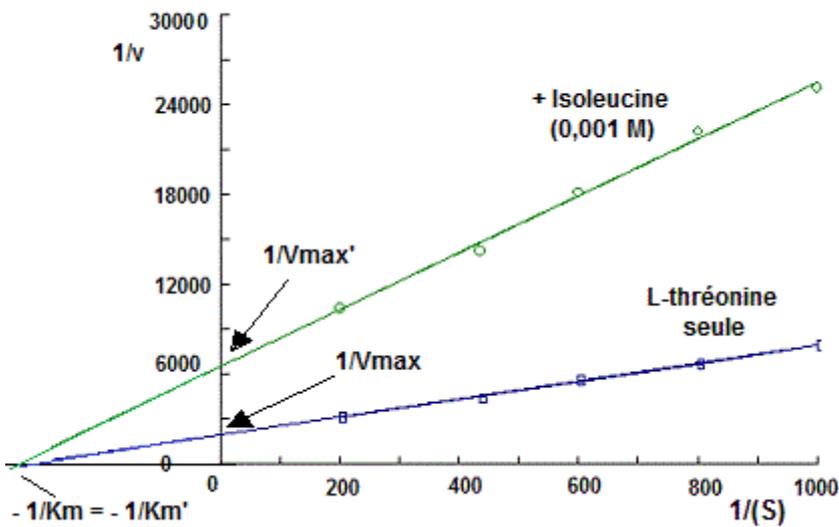
Réponse

1- Paramètres K_m et V_{max} de la L-thréonine hydrolyase pour la L-thréonine comme substrat: $K_m = 0,0029 M$, $V_{max} = 0,0005$ mole/min/ml d'enzyme.

- En présence de la D-allothréonine comme inhibiteur:



- En présence de la Isoleucine:



2- Paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'enzyme pour son substrat utilisé en absence et en présence de chacun des deux inhibiteurs (K_m' et V_{max}' = constantes en présence d'un inhibiteur):

| | V_{max} (mole/min/ml d'enzyme) | K_m (M) | Type d'inhibition vis à vis de L- thréonine |
|------------------------------------|--|-----------|---|
| L-thréonine seule | 0,000500 | 0,00290 | - |
| En présence de D- allothréonine | 0,000500 | 0,00625 | compétitive |
| En présence de L- isoleucine | 0,000153 | 0,00290 | non compétitive |

Exercice N°7

La carboxypeptidase (E.C.3.4.17.1) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la carboxyphénylalanine comme substrat. Son étude cinétique avec le substrat seul ou en présence du phényl-butyrate ou du benzoate, donne les vitesses initiales suivantes:

| Carboxyphénylalanine (M) | Vitesse initiale (unités) | | |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | Substrat seul | Avec Phényl-butyrate (0,002 M) | Avec benzoate (0,05 M) |
| 0,0125 | 133 | 28,5 | - |
| 0,0175 | - | - | 30,3 |
| 0,0250 | 167 | 50,00 | 33,3 |
| 0,0400 | - | 71,5 | - |
| 0,0500 | 190 | - | 38,4 |
| 0,0550 | - | 90,9 | - |
| 0,1000 | 205 | - | 40,8 |

1- Déterminer les constantes cinétiques K_m et V_{max} de la carboxypeptidase en absence des inhibiteurs.

- 2- Calculer K_m et V_{max} de l'enzyme en présence des inhibiteurs.
- 3- Quels types d'inhibiteurs constituent le phényl-butyrates et le benzoate vis à vis du substrat, la carboxyphénylalanine.
- 4- Calculez les constantes K_i pour chaque inhibiteur.

Réponse

1- les constantes cinétiques K_m et V_{max} de la carboxypeptidase en absence des inhibiteurs: $K_m = 8,35 \text{ mM}$, $V_{max} = 222 \text{ unités}$.

2- En présence du phényl-butyrates: $K_m' = 98,9 \text{ mM}$, $V_{max}' = 250 \text{ unités}$ (considérée proche de 222 unités (= V_{max}))

- En présence du benzoate: $K_m' = 8,11 \text{ mM}$ (considérée proche de 8,35 mM (= K_m)), $V_{max}' = 44,3 \text{ unités}$

3- Types d'inhibition: Phényl-butyrates = inhibiteur compétitif vis à vis de la L-thréonine

- Benzoate = inhibiteur non compétitif vis à vis de la L-thréonine

4- Valeurs de la constante d'inhibition:

- Pour phényl-butyrates: K_m a augmenté du facteur $(1 + (I/K_i))$, donc: $K_m' = K_m \times (1 + (I/K_i))$ c'est à dire: $98,9 = 8,35 (1 + (0,002/K_i))$, donc: $K_i =$ pour phényl-butyrates = 0,2 mM.

- Pour le benzoate: V_{max} a diminué du facteur $(1 + (I/K_i))$, donc: $V_{max}' = V_{max} / (1 + (I/K_i))$ c'est à dire: $44,3 = 222 / (1 + (0,05/K_i))$, donc: $K_i = 12,4 \text{ mM}$

Exercice N°8

La créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme présente dans les cellules musculaires. Elle catalyse la réaction suivante:



1- La purification de la CPK à partir du muscle squelettique de lapin a été faite selon le protocole suivant:

| Extraits | Etapes | Protéines (mg) | Activité totale (UI) |
|----------|--|----------------|----------------------|
| E1 | Broyage et homogénéisation de muscle squelettique de lapin | 40000 | 189000 |

| | | | |
|----|---|------|--------|
| E2 | Surnageant de centrifugation après précipitation par NH ₄ Cl à pH = 9,0 | 9050 | 179000 |
| E3 | Surnageant de centrifugation après précipitation par MgSO ₄ | 3250 | 143000 |
| E4 | Précipitation par l'éthanol à froid. Dissolution du précipité dans une solution de citrate d'ammonium | 2970 | 138000 |
| E5 | Dialyse | 2480 | 129000 |
| E6 | Cristallisation à -10°C | 2150 | 112500 |

- Calculer le taux de purification pour les extraits E5 et E6 par rapport à E1
- La dernière étape est-elle indispensable ?

2- Etude de la cinétique de la CPK.

On mesure la vitesse initiale (v_i) de la CPK en fonction de concentrations croissantes d'ATP (= substrat S). La concentration en créatine étant constante. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant:

| ATP (mmol.dm ⁻³) | v_i (mole de produit apparu/seconde) |
|------------------------------|--|
| 0,20 | 1,36 |
| 0,27 | 1,70 |
| 0,41 | 2,22 |
| 0,79 | 3,12 |

- Déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la CPK pour l'ATP.
- Sachant que la constante K_m de l'enzyme pour la créatine est de 0,019 mol.dm⁻³, comparez les affinités respectives de la CPK pour les deux substrats. Les quantités d'ATP et de créatine par gramme de tissu musculaire sont 4 μ mol/g et 25 μ mol/g, respectivement.

3- Effet du Zinc sur l'activité de la CPK

La vitesse initiale de l'enzyme est mesurée en absence et en présence de deux concentrations de Zn⁺⁺ (C1 et C2). Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant:

| ATP (mmol.dm ⁻³) | v_i (mole de produit apparu/seconde) | |
|------------------------------|--|--|
| | Zn ⁺⁺ = C1 mol.dm ⁻³ | Zn ⁺⁺ = C2 mol.dm ⁻³ |
| 0,20 | 1,00 | 1,16 |
| 0,27 | 1,23 | 1,45 |
| 0,41 | 1,61 | 1,89 |
| 0,79 | 2,27 | 2,70 |

Comment se comporte le Zn⁺⁺ vis à vis de l'ATP ?

Réponse

1- Tableau de purification de la créatine phosphokinase.

| Extraits | AS (U/mg) | Taux de purification | Rendement (%) |
|----------|-----------|---------------------------|---------------------------------|
| E1 | 4,725 | 1 fois | 100 |
| E2 | 19,78 | 4,19 fois (= 19,79/4,725) | 94,71 (= (179000/189000) x 100) |
| E3 | 44 | 9,31 fois | 75,66 |
| E4 | 46,46 | 9,83 fois | 73 |
| E5 | 52 | 11 fois | 68,25 |
| E6 | 52,33 | 11,07 fois | 59,52 |

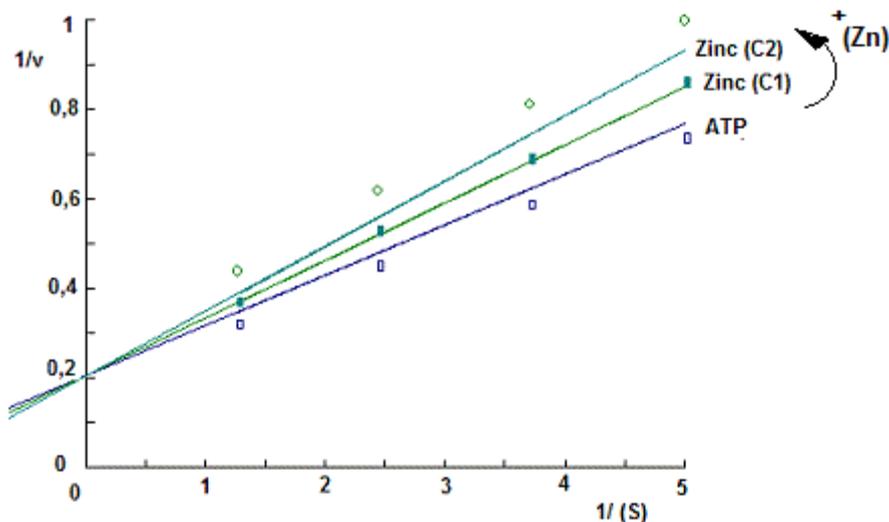
Avec ce protocole de purification, la créatine phosphokinase a été purifiée 11 fois avec une perte de 31,75% (= 100 - 68,25) (étape E5). En ajoutant l'étape E6, on perd plus d'enzyme sans gain dans la purification par rapport à l'étape précédente. Donc, la dernière étape n'est pas indispensable.

2- Etude de la cinétique de la CPK.

- Paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la CPK pour l'ATP (voir courbe ci dessous): $K_m = 0,57 \text{ mM}$, $V_{max} = 5 \text{ mol/s}$

- L'affinité de l'enzyme pour l'ATP est plus grande que celle pour la créatine

3- Effet de Zn^{++} sur l'activité de la CPK: Zn^{++} est inhibiteur compétitif vis à vis de l'ATP



Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

