

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 mg/ml) dans le milieu réactionnel. Enfin, la masse molaire de l'enzyme E est de 100.000 dalton .
Calculez l'activité spécifique en U.mg^{-1} .
6. On considère que l'enzyme a été totalement purifiée. Calculez la valeur de la constante catalytique (k_{cat}) en 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 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
v_i (U. DO. $\cdot\text{min}^{-1}$)	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⁻¹) pour différentes concentrations [S₀] du substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

[S ₀] (μM)	v _i (nM.s ⁻¹)	
	1ère expérience: [Isomérase] = 10 pM	2è expérience: [Isomérase] = 10 pM + [Einc] = 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.

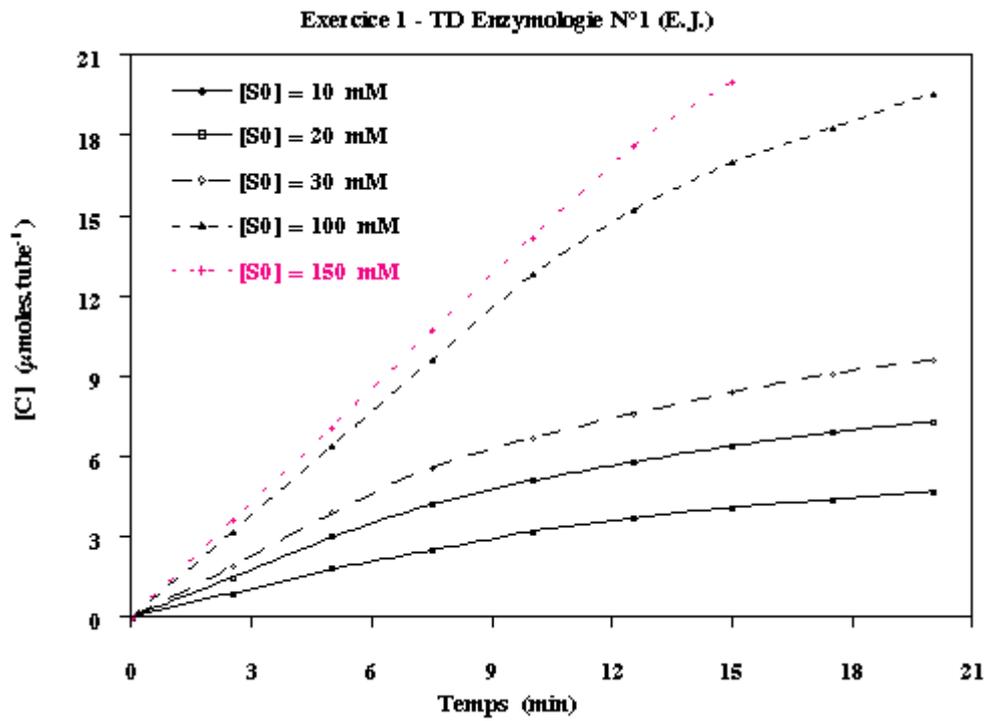
2. Calculez la valeur de la constante catalytique de l'isomérase ($k_{cat_{Iso}}$).

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

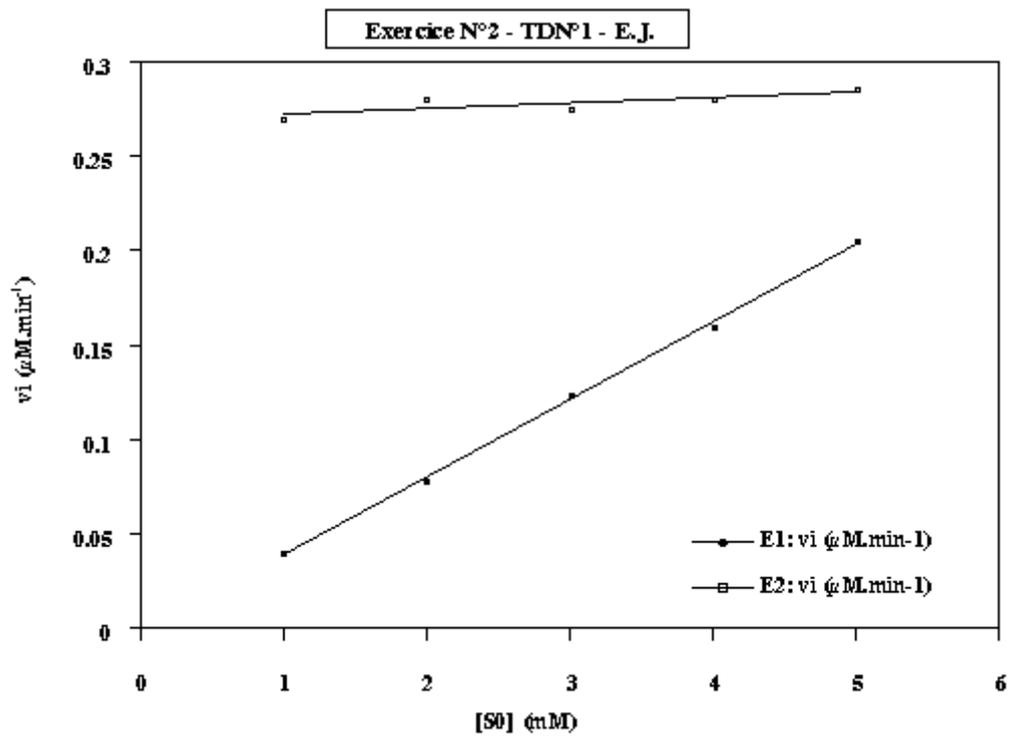
3. Un seul paramètre cinétique diffère entre les 2 expériences (d'un facteur 2). Lequel et pourquoi ?

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

Corrigé



Exercice N°2



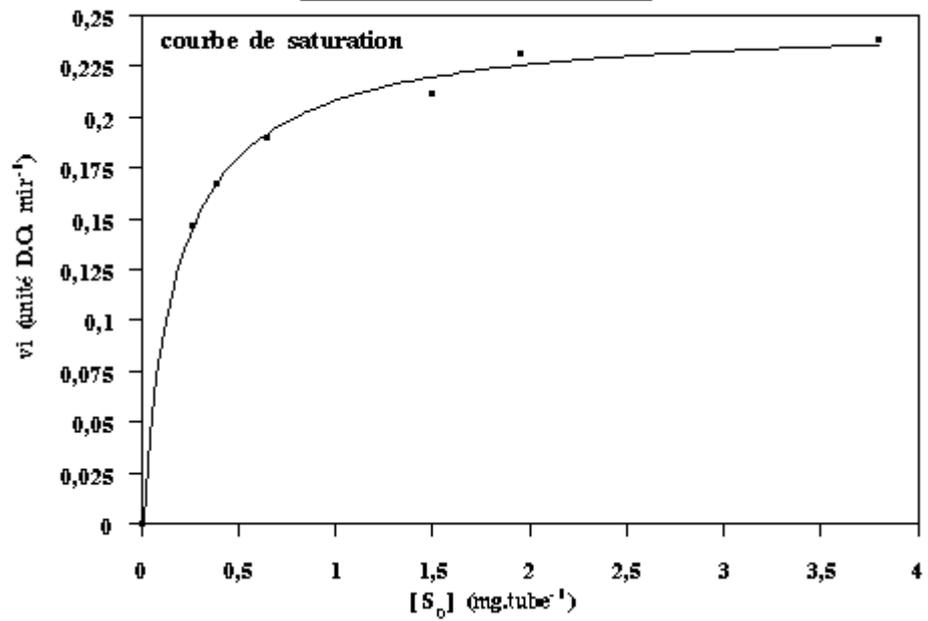
Dans les 2 cas, malgré les apparences, il s'agit de courbe de saturation (hyperboles) : $v_i = f([S]_0)$.

La gamme de concentrations de substrat étudiée (1 à 5 mM) n'est donc adaptée à aucune des 2 enzymes :

- pour E1, la gamme n'est pas assez grande \implies on ne détermine que les premiers points de la courbe de saturation.
- pour E2, la gamme étudiée ne correspond qu'aux v_i les plus élevées \implies il faut étudier des concentrations supplémentaires inférieures à 1 mM pour avoir le début de la courbe de saturation.
- Par ailleurs : $K_M^{E1} > K_M^{E2}$. En effet, pour $[S]_0 = 5 \text{ mM}$, E2 est saturée alors que l'on est au début de la courbe de saturation pour E1.
- Vue l'allure de ces 2 courbes de saturation, est probable que : $V_{\text{Max}}^{E1} > V_{\text{Max}}^{E2}$.

Exercice N°3

Exercice N°3 - TD N°1 - E.J



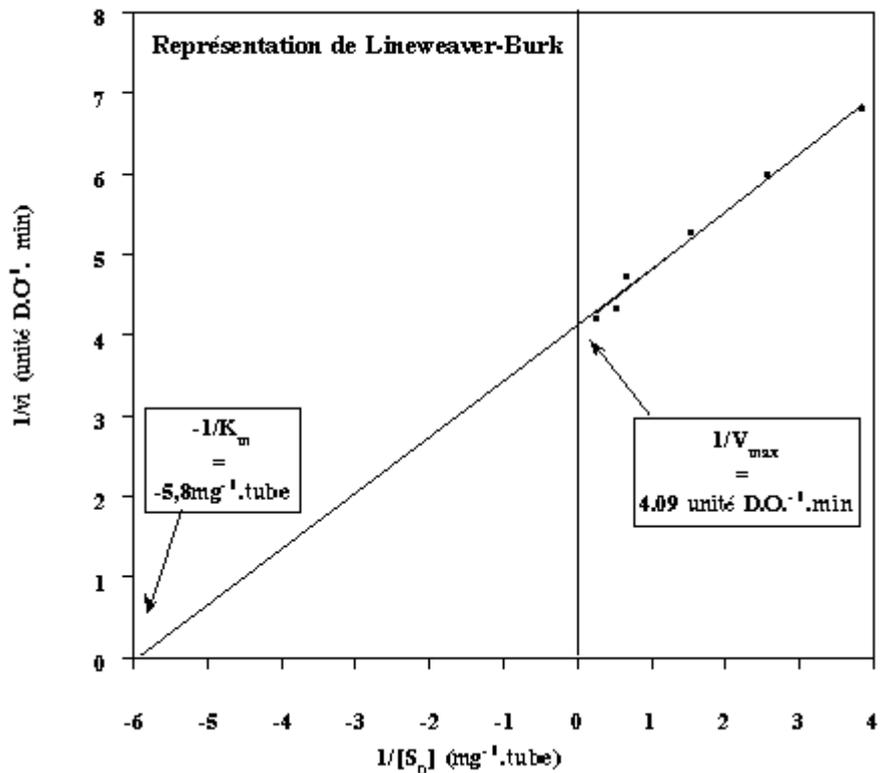
Les valeurs des paramètres cinétiques déterminées d'après la représentation des doubles inverses (figure ci-dessus) sont :

- $1/V_{Max} = 4,09$ (unités D.O.)⁻¹.min
- $-1/K_M = -5,8$ mg⁻¹.tube

Donc :

- $V_{Max} = 0,24$ unités D.O. min⁻¹
- $K_M = 0,17$ mg.tube⁻¹

Exercice N°3 - TD N°1 - E.J



a) Calcul de V_{Max}

Une vitesse est la variation d'une concentration (et non d'une quantité) par unité de temps.

La valeur du coefficient d'extinction pondéral donné pour le PNP est : $\epsilon^{1\%} = 1260$ g⁻¹.100 mL.cm⁻¹.

Ce qui signifie qu'une solution de PNP à 1% a une absorbance de 1260 unités D.O., pour un

trajet optique de 1 cm.

Donc : 1% = 1g dans 100 mL ---> 1260 unités D.O.

<=> 139 g dans 100 mL ---> 1260 x 139 unités D.O.

<=> 139 g dans 1000 mL ---> (1260 x 139) / 10 unités D.O.

<=> 1 mole de PNP par litre ---> 17514 unités D.O.

On obtient ainsi la valeur du coefficient d'extinction molaire : $\epsilon_M^{\text{PNP}} = 17514 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

On peut maintenant recalculer V_{Max} à partir de cette valeur et de la loi de Beer-Lambert :

$$V_{\text{Max}} = 0,24 \text{ unités D.O.} \cdot \text{min}^{-1} = 0,24 / (17514 \times 1) = 1,37 \cdot 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1} = 13,7 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

b) Calcul de K_M

La masse molaire dont il faut tenir compte est celle du SUBSTRAT, puisque l'on calcule K_M !

Par ailleurs, le volume réactionnel est de 10 mL.

Donc : $K_M = 0,17 \text{ mg} \cdot \text{tube}^{-1} = 0,17 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ dans 10 mL

<=> $K_M = (0,17 \cdot 10^{-3} / 371) \text{ moles dans 10 mL} = ((0,17 \cdot 10^{-3} \times 1000) / (371 \times 10)) \text{ moles dans 1L.}$

$$K_M = 45,8 \mu\text{M}$$

Calcul de l'activité spécifique (A.S.)

Expression de V_{Max} :

$$V_{\text{Max}} = 13,7 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} = 13,7 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = 13,7 \text{ unités} \cdot \text{L}^{-1}$$

Du fait de l'unité choisie pour la concentration, le volume est dans un premier temps 1 litre de milieu réactionnel. Or, la réaction s'effectue dans un volume réel de 10 mL.

$$\text{Donc : } V_{\text{Max}} = 0,137 \text{ unités dans 10 mL} = 0,137 \text{ U} \cdot \text{tube}^{-1}$$

Expression de $[E_0]$

On met 0,2 mL de solution d'enzyme à une concentration initiale de 10 mg.mL⁻¹ dans un volume total de 10 mL.

$$\text{Donc : } [E_0] = 0,2 \text{ (mL)} \times 10 \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = 2 \text{ mg dans 10 mL} = 2 \text{ mg} \cdot \text{tube}^{-1}$$

Les unités de V_{Max} et de $[E_0]$ sont cohérentes et les valeurs tiennent compte du volume réactionnel réel.

$$\text{L'activité spécifique est donc : } \text{A.S.} = V_{\text{Max}} / [E_0] = (0,137 \text{ unités} \cdot \text{tube}^{-1}) / (2 \text{ mg} \cdot \text{tube}^{-1}) = 68,5 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$$

Question N°4 :
 Courbe de saturation et représentation des doubles inverses

Les paramètres cinétiques sont déterminés à partir de la [représentation de Lineweaver-Burk](#) (figure ci-contre).

$$k_{cat}^{Iso} = V_{max}^{Iso} / [Iso]_0 = 2,56 \cdot 10^{-9} \text{ (M}\cdot\text{s}^{-1}) / 10 \cdot 10^{-12} \text{ (M)}$$

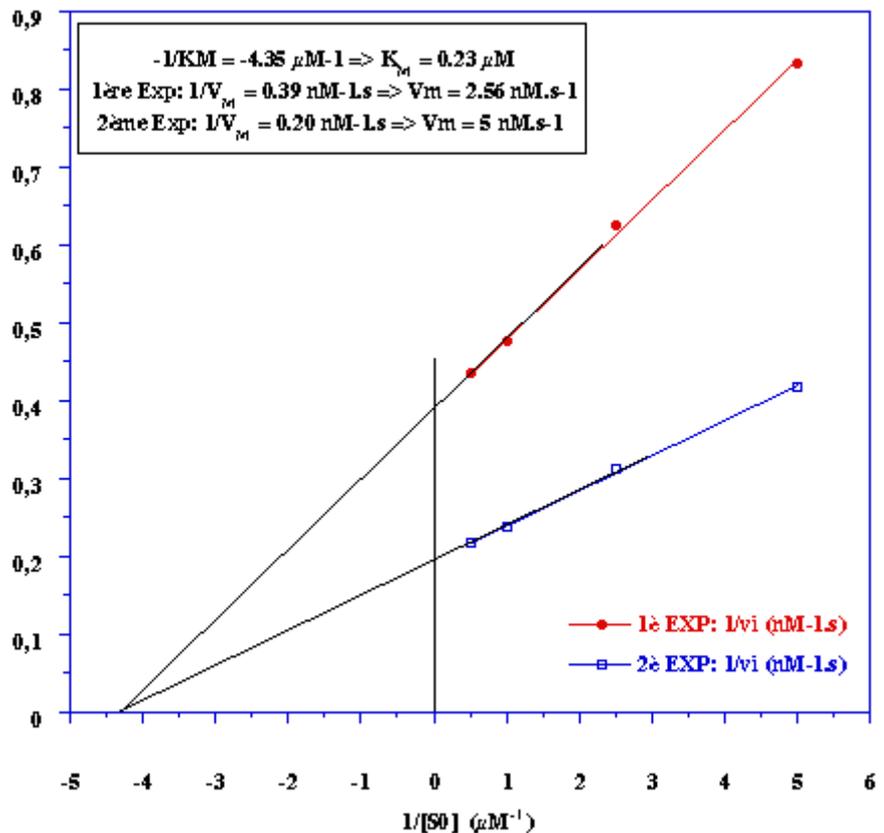
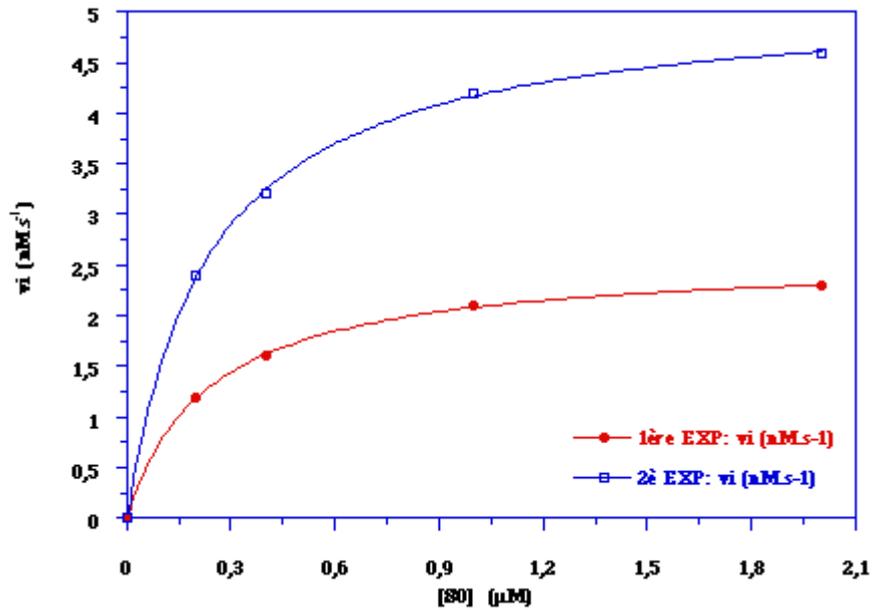
$$\implies k_{cat}^{Iso} = 256 \text{ s}^{-1} = 15360 \text{ min}^{-1}$$

Donc : $k_{cat}^{Iso} = k_{cat}^{Einc}$ et $K_M^{Iso} = K_M^{Einc}$

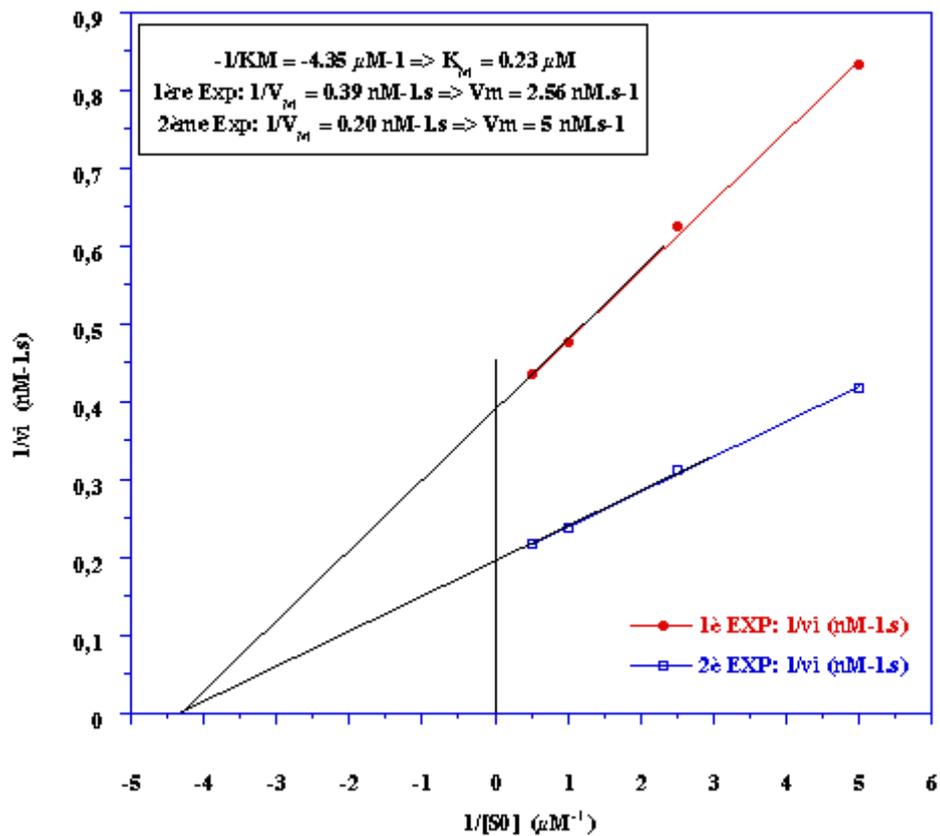
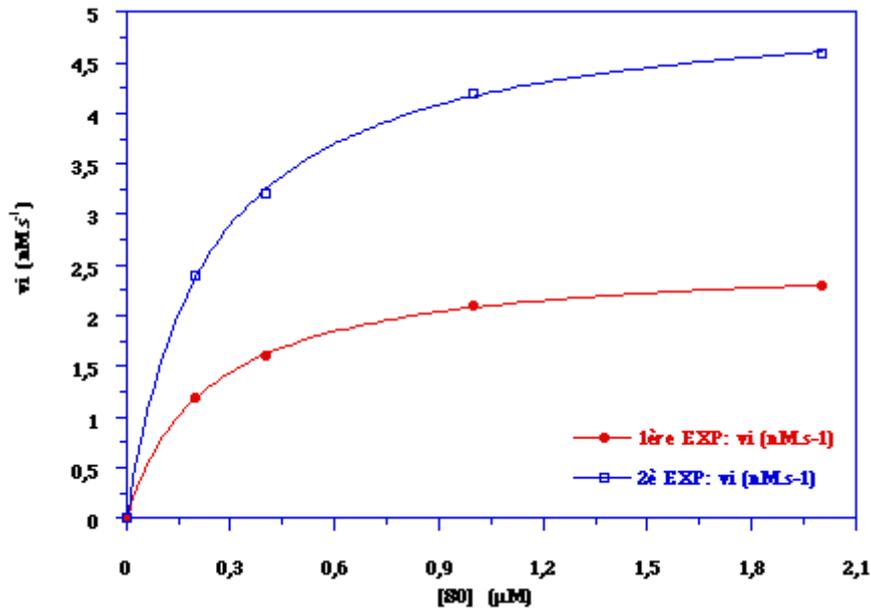
Par ailleurs :

$$V_{max}^{2\text{ème expérience}} = V_{max}^{(Iso)} + V_{max}^{(Einc)} = 2 \times V_{max}^{1\text{ère expérience}}$$

Donc puisque V_{max} double quand la concentration en enzyme double et que les autres paramètres ne sont pas modifiés, c'est que E_{inc} est l'isomérase.



Question N°4 : Courbe de saturation et représentation des doubles inverses



Les paramètres cinétiques sont déterminés à partir de la [représentation de Lineweaver-Burk](#) (figure ci-contre).

$$k_{\text{cat}}^{\text{Iso}} = V_{\text{max}}^{\text{Iso}} / [\text{Iso}]_0 = 2,56 \cdot 10^{-9} (\text{M} \cdot \text{s}^{-1}) / 10 \cdot 10^{-12} (\text{M})$$

$$\implies k_{\text{cat}}^{\text{Iso}} = 256 \text{ s}^{-1} = 15360 \text{ min}^{-1}$$

Donc : $k_{\text{cat}}^{\text{Iso}} = k_{\text{cat}}^{\text{Einc}}$ et $K_M^{\text{Iso}} = K_M^{\text{Einc}}$

Par ailleurs :

$$V_{\max}^{2\text{ème expérience}} = V_{\max}^{(\text{Iso} + \text{Einc})} = 2 \times V_{\max}^{1\text{ère expérience}}$$

Donc puisque V_{\max} double quand la concentration en enzyme double et que les autres paramètres ne sont pas modifiés, c'est que E_{inc} est l'isomérase.

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

