

## 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  $100.000 \text{ dalton}$ . Calculez l'activité spécifique en  $\text{U.mg}^{-1}$ .
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 vi ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,040	0,078	0,124	0,160	0,205
E2 vi ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )	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
vi (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  $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pour différentes concentrations  $[\text{S}_0]$  du substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

$[\text{S}_0]$ ( $\mu\text{M}$ )	$v_i$ ( $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$ )	
	1ère expérience: $[\text{Isomérase}] = 10 \text{ pM}$	2è expérience: $[\text{Isomérase}] = 10 \text{ pM} + [\text{Einc}] = 10 \text{ pM}$
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  $V_{\text{max}}$  et  $K_M$ , à partir de la représentation graphique de votre choix.

2. Calculez la valeur de la constante catalytique de l'isomérase ( $k_{\text{cat}_{\text{Iso}}}$ ).

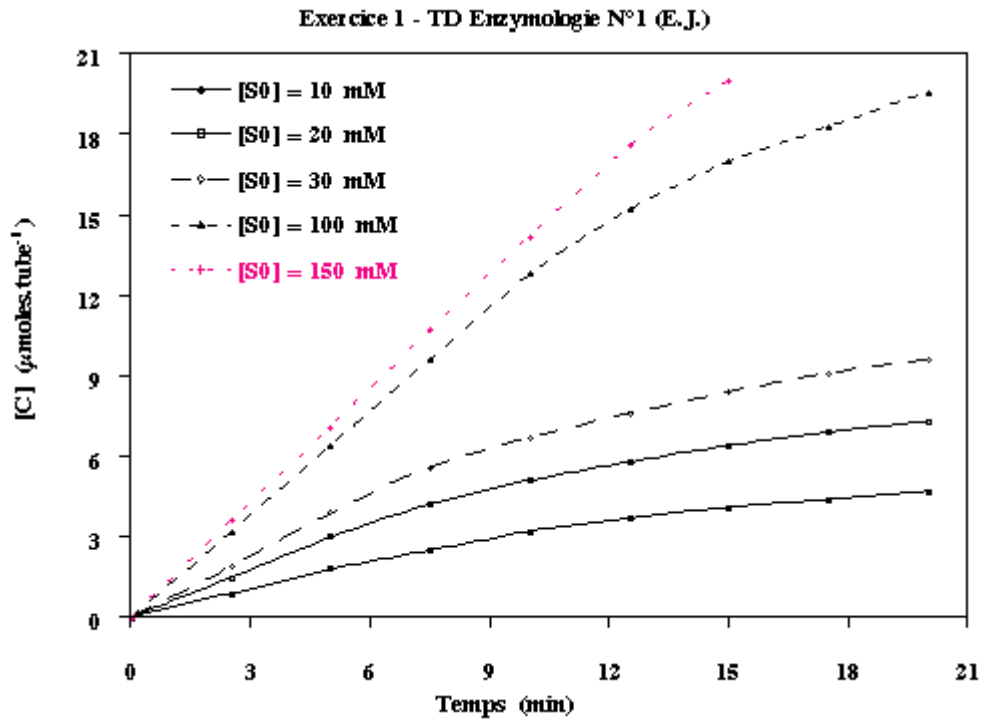
On a déterminé la constante catalytique de l'enzyme inconnue:  $k_{\text{cat}_{\text{Einc}}} = 15360 \text{ min}^{-1}$ .

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

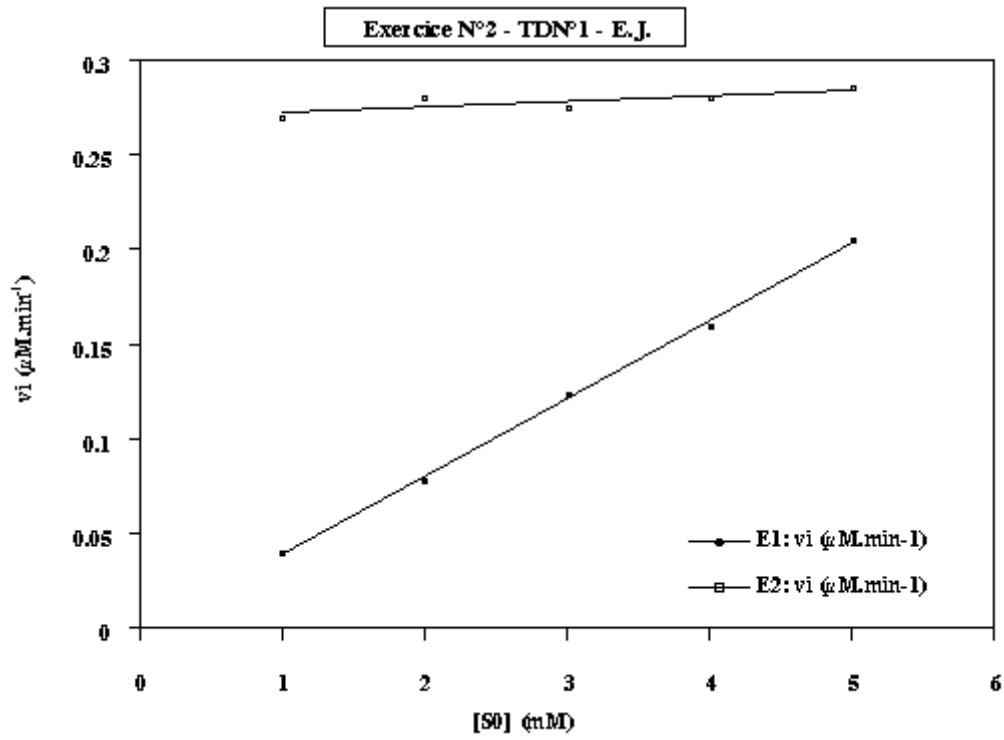
4. En conclusion, l'enzyme inconnue dont le gène a été cloné est-elle bien l'isomérase ?

---

**Corrigé**



Exercice N°2



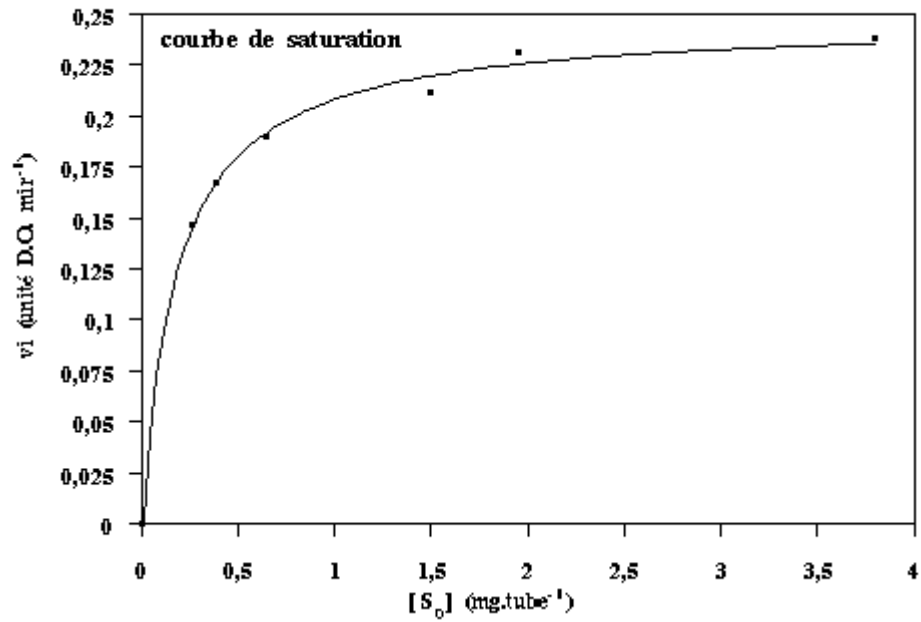
Dans les 2 cas, malgré les apparences, il s'agit de courbe de saturation (hyperboles) :  $v_i = f([S]_0)$ .

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



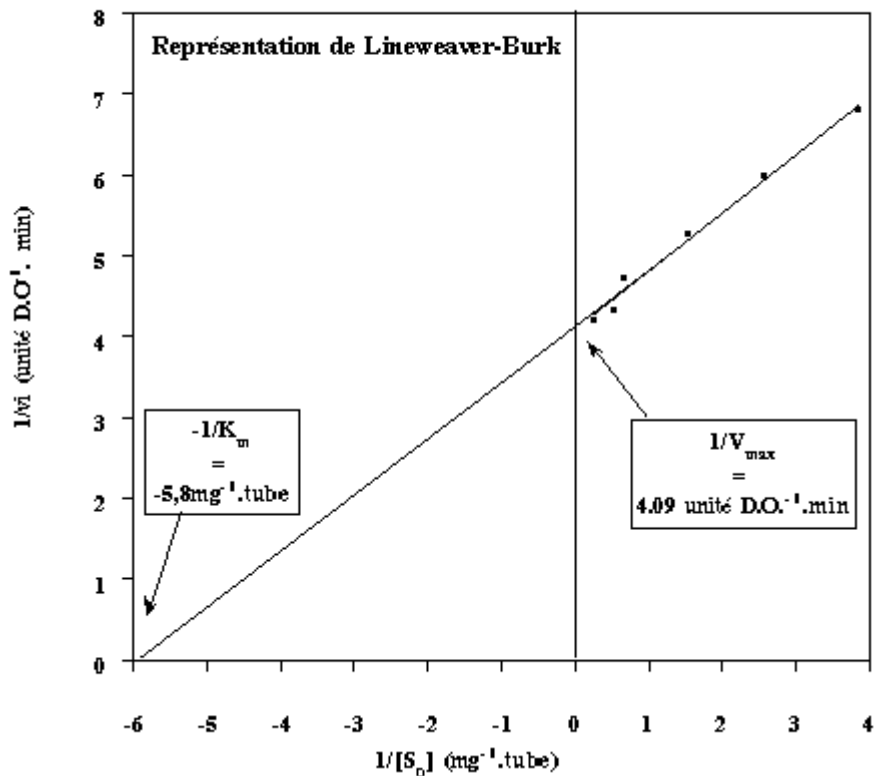
Les valeurs des paramètres cinétiques déterminées d'après la représentation des doubles inverses (figure ci-dessus) sont :

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

Donc :

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

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<sup>-1</sup>.100 mL.cm<sup>-1</sup>.

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  $V_{\text{Max}}$  à partir de cette valeur et de la loi de Beer-Lambert :

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

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

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

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

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

Expression de  $V_{\text{Max}}$  :

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

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<sup>-1</sup> 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  $V_{\text{Max}}$  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).

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

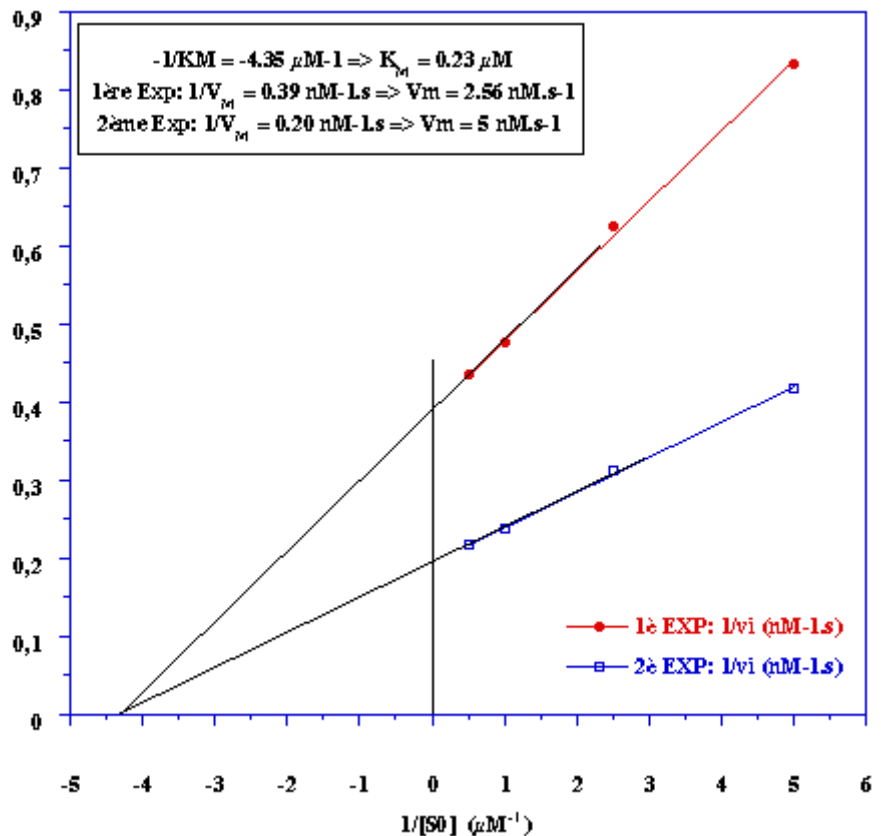
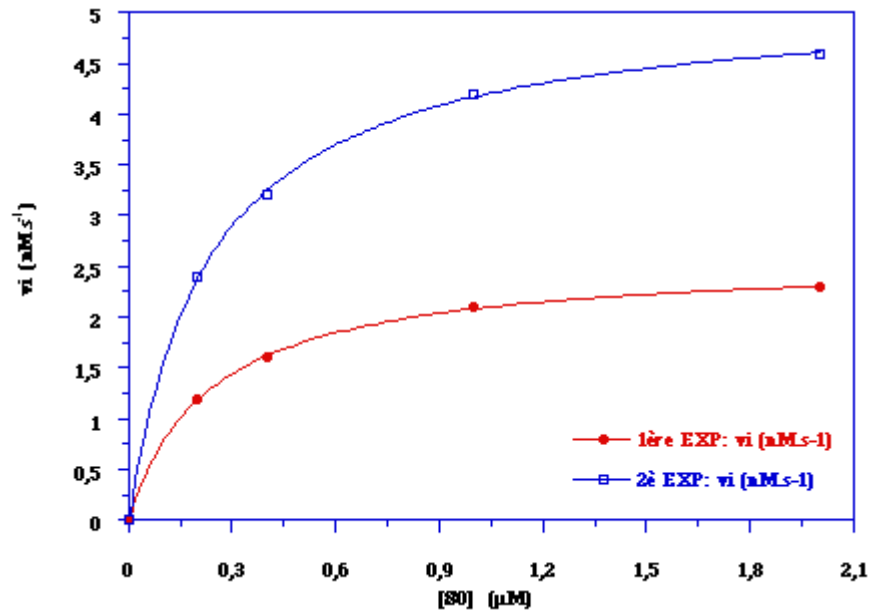
$$\implies k_{cat}^{Iso} = 256 s^{-1} = 15360 min^{-1}$$

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

Par ailleurs :

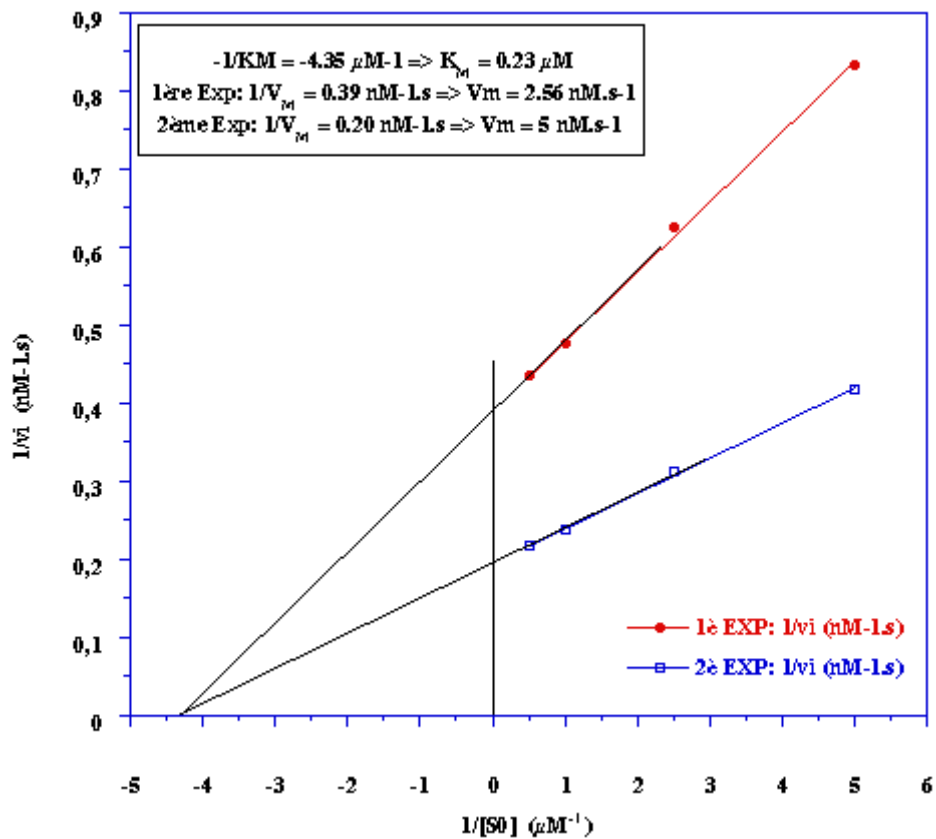
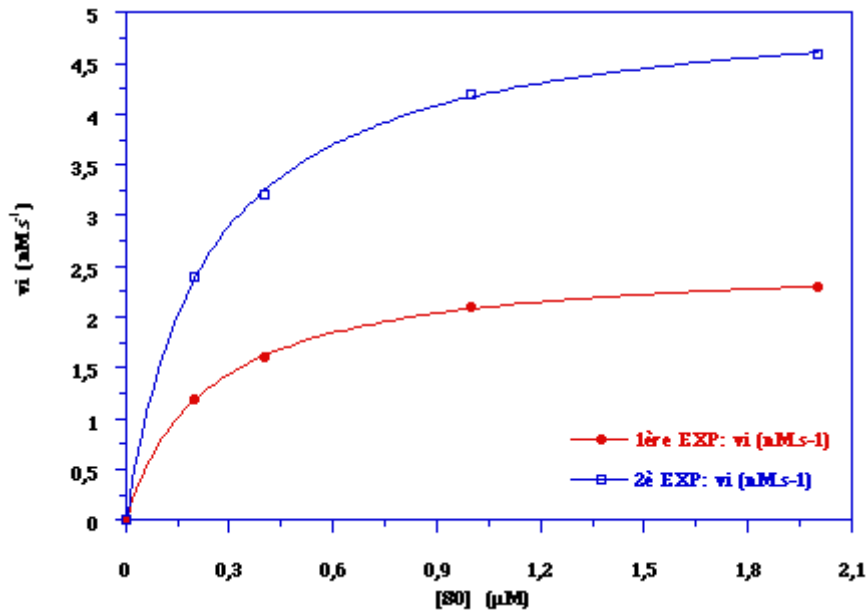
$$V_{max}^{2ème \text{ expérience}} = V_{max}^{(Iso)} + V_{max}^{(Einc)} = 2 \times V_{max}^{1ère \text{ expérience}}$$

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).

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

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

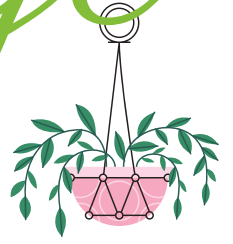
Donc :  $k_{\text{cat}}^{\text{Iso}} = k_{\text{cat}}^{\text{Einc}}$  et  $K_M^{\text{Iso}} = K_M^{\text{Einc}}$

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  $E_{\text{inc}}$  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

