

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 $\text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$) pour différentes concentrations $[\text{S}_0]$ du substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

$[\text{S}_0]$ (μM)	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_{max} et K_M , à partir de la représentation graphique de votre choix.

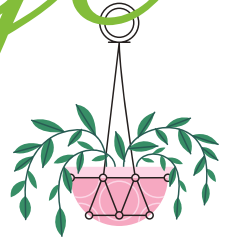
2. Calculez la valeur de la constante catalytique de l'isomérase ($k_{\text{cat}_{\text{Iso}}}$).

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 ?

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

