

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 μ 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 doubles 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 3μ 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 1μ 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 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

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. 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 $[S_0]$ 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 + $[E_{inc}]$ = 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: $k_{cat}^{E_{inc}} = 15360 \text{ min}^{-1}$.

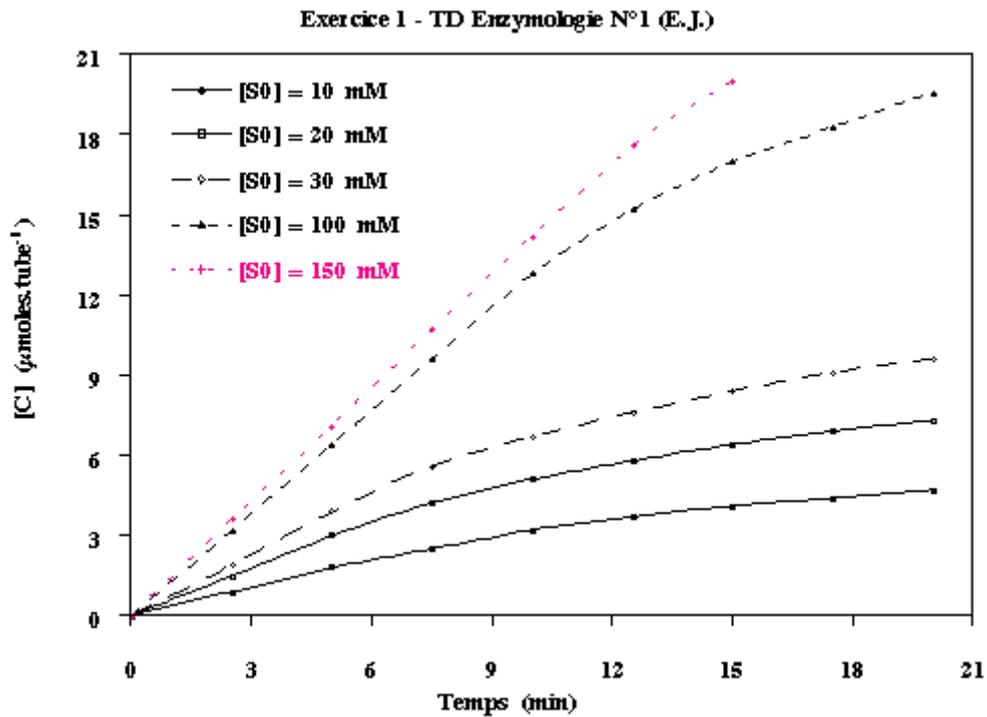
3. Un seul paramètre cinétique diffère entre les 2 expériences (d'un facteur 2). Lequel et pourquoi ?

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

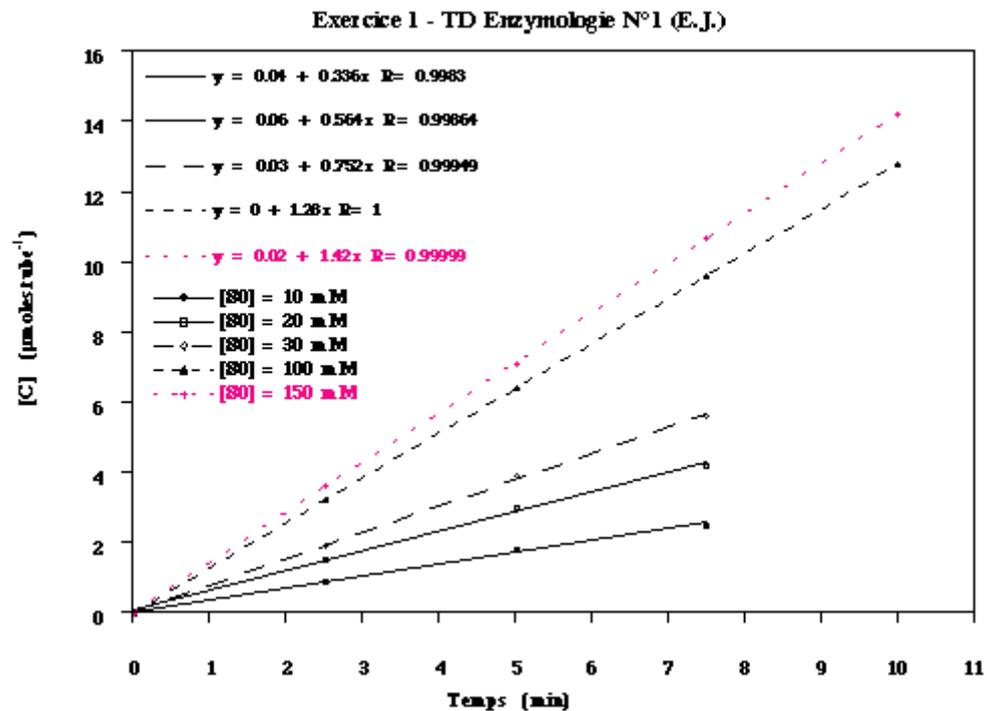
Correction des Exercices 1, 2, 3 et 4.

Question N°1

a. Tracé des cinétiques de la réaction enzymatique

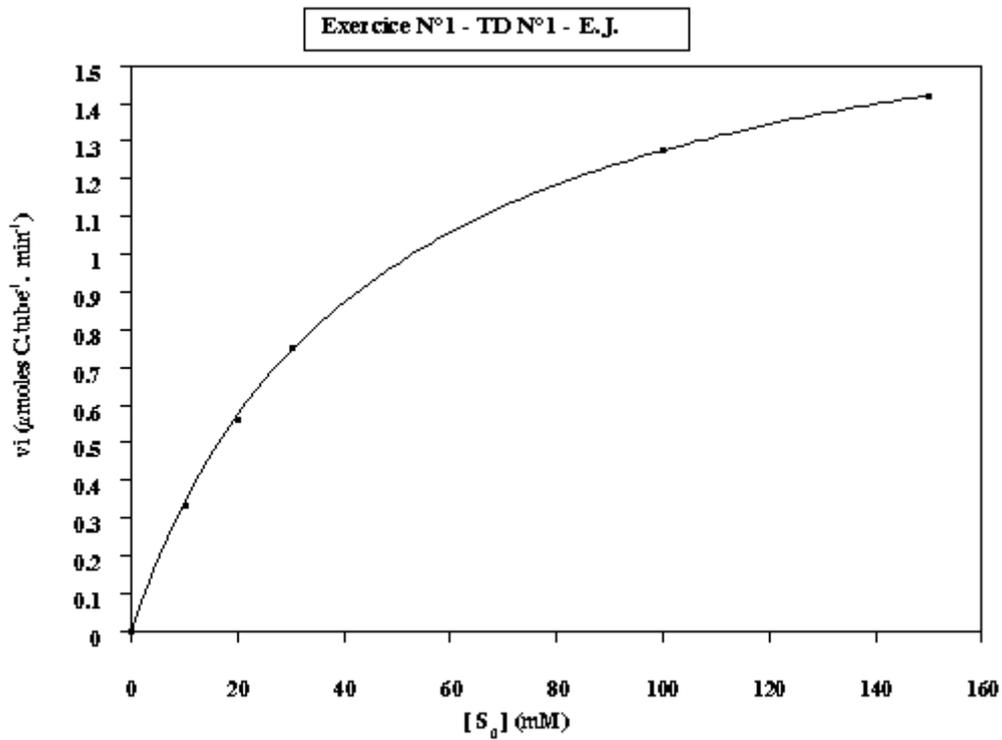


b. Détermination graphique des vitesses initiales à partir des cinétiques



| $[S_0]$ (mM) | v_i ($\mu\text{moles C.tube}^{-1}.\text{min}^{-1}$) |
|--------------|---|
| 10 | 0,34 |
| 20 | 0,56 |
| 30 | 0,75 |
| 100 | 1,28 |
| 150 | 1,42 |

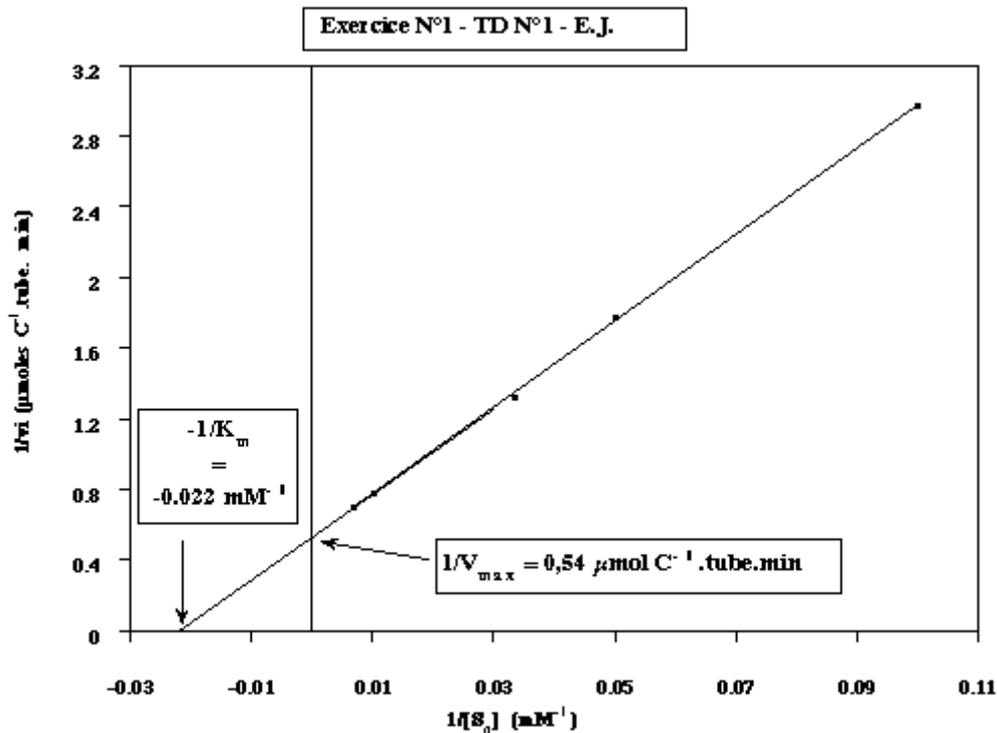
c. Courbe de saturation issue des cinétiques



$$V_{\text{Max}} = 1,47 \mu\text{moles C.tube}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

$$K_M = 24 \text{ mM}$$

d. Représentation des doubles inverses ou représentation de Lineweaver-Burk



| | |
|---|-----------------------------------|
| $1/V_{\text{Max}} = 0,54 \mu\text{moles C}^{-1}.\text{tube}.\text{min}$ | $-1/K_M = -0,022 \text{ mM}^{-1}$ |
| $V_{\text{Max}} = 1,85 \mu\text{moles C.tube}^{-1}.\text{min}^{-1}$ | $K_M = 45,5 \text{ mM}$ |

e. Calcul de k_{cat}

Volume réactionnel = 2 mL substrat + 1 mL enzyme à une concentration de 3 μM => volume du tube = 3 mL = $3 \cdot 10^{-3}$ L

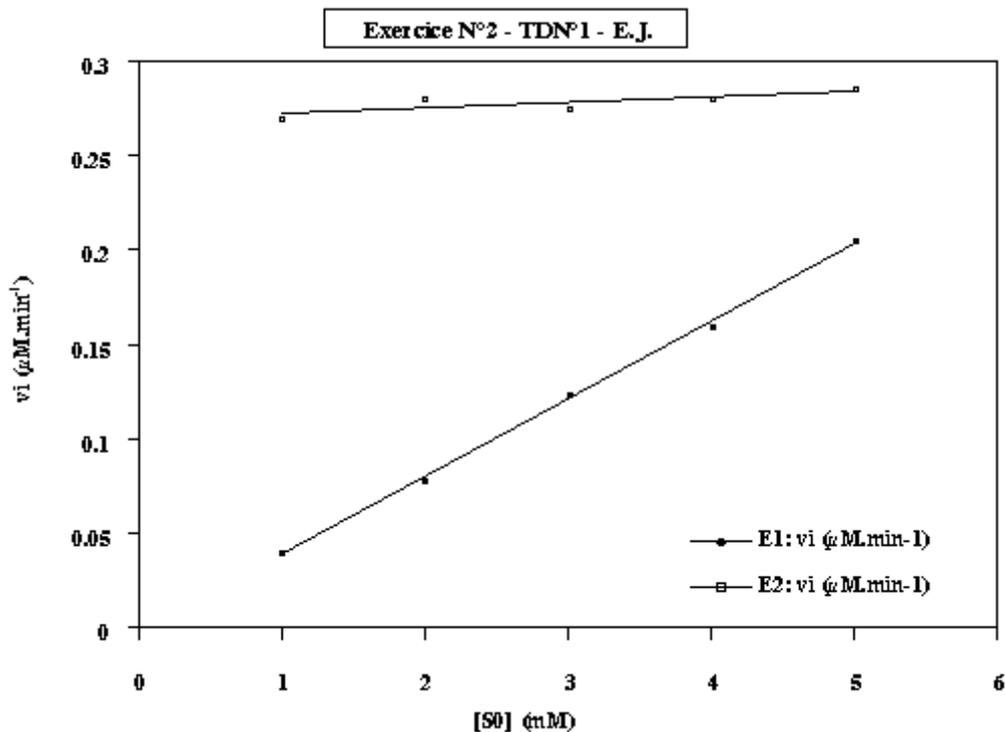
Donc : $[E_0] = 3 \mu\text{M} \times (1 \text{ mL} / 3 \text{ mL}) = 1 \cdot 10^{-6} \text{ moles.L}^{-1}$

$V_{\text{Max}} = 1,85 \mu\text{moles C.tube}^{-1}.\text{min}^{-1} = 1,85 \cdot 10^{-6} \text{ moles C} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} = 6,17 \cdot 10^{-4} \text{ moles C.L}^{-1}.\text{min}^{-1} = 617 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}$

$V_{\text{Max}} = k_{\text{cat}} \cdot [E_0] \Rightarrow k_{\text{cat}} = V_{\text{Max}} / [E_0] = 617 \text{ min}^{-1} = 10,3 \text{ s}^{-1}$

[l'acte catalytique a lieu 60 fois moins en 1 seconde qu'en 1 minute].

Question N°2



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

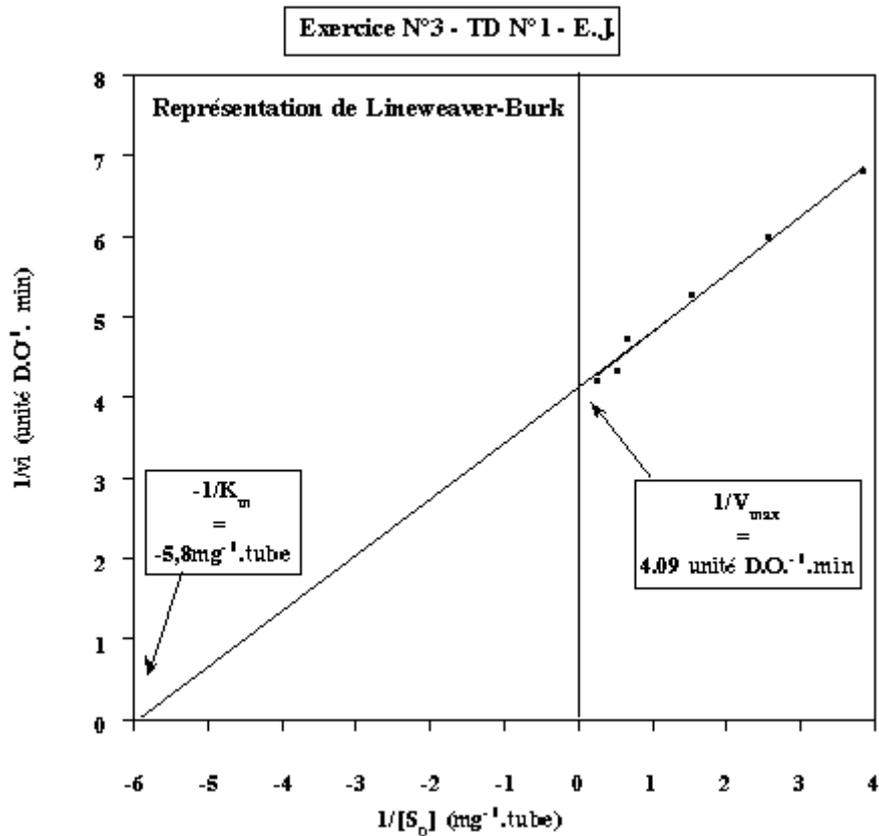
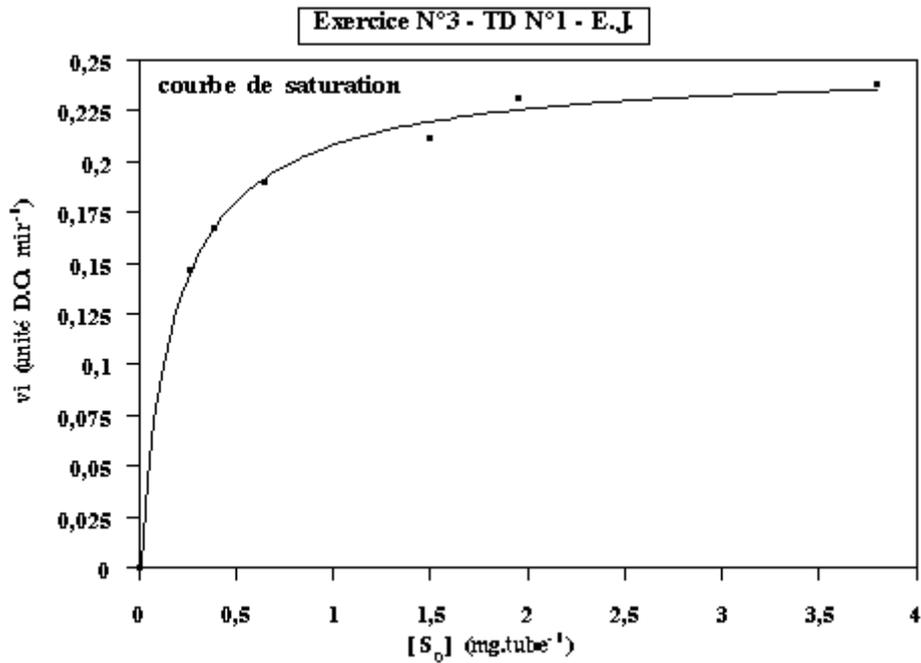
La gamme de concentrations de substrat étudiée (1 à 5 mM) n'est donc adaptée à **aucune** des 2 enzymes :

- pour E1, la gamme n'est pas assez grande : 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 : 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 $[S]_0 = 5$ 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, il est probable que $V_{\text{Max}}^{E1} > V_{\text{Max}}^{E2}$.

Exercice N°3



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

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

Donc :

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

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 :
 $\epsilon^{1\%} = 1260 \text{ g}^{-1} \cdot 100 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1}$.

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 :

$V_{\text{Max}} = 0,24 \text{ unités D.O. min}^{-1} = 0,24 / (17511 \times 1) = 1,37 \cdot 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$
 $= 13,7 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$

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

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

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

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

Expression de V_{Max} :

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

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.

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

d. 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.

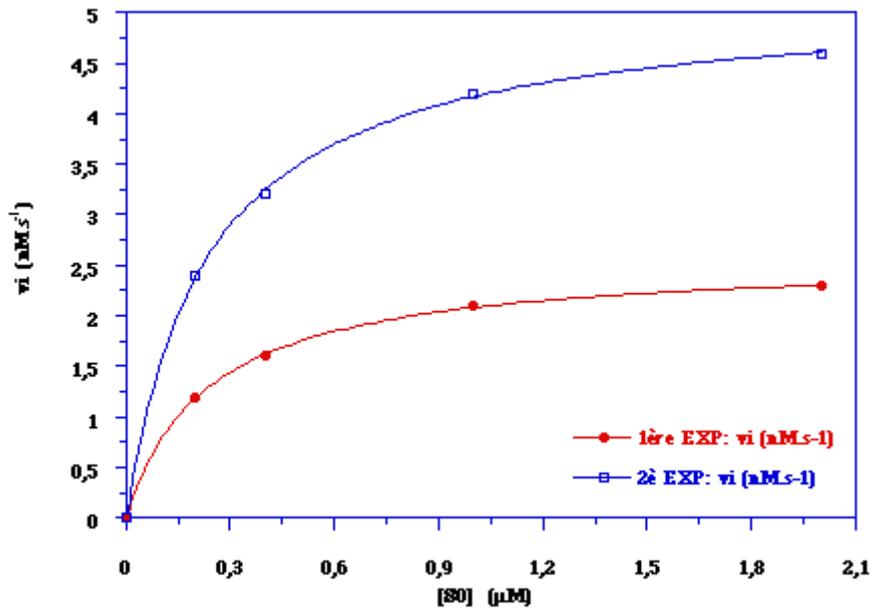
$$\text{Donc : } [E_0] = 0,2 \text{ (mL)} \times 10 \text{ (mg.mL}^{-1}) = 2 \text{ mg dans } 10 \text{ mL} = 2 \text{ mg.tube}^{-1}$$

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

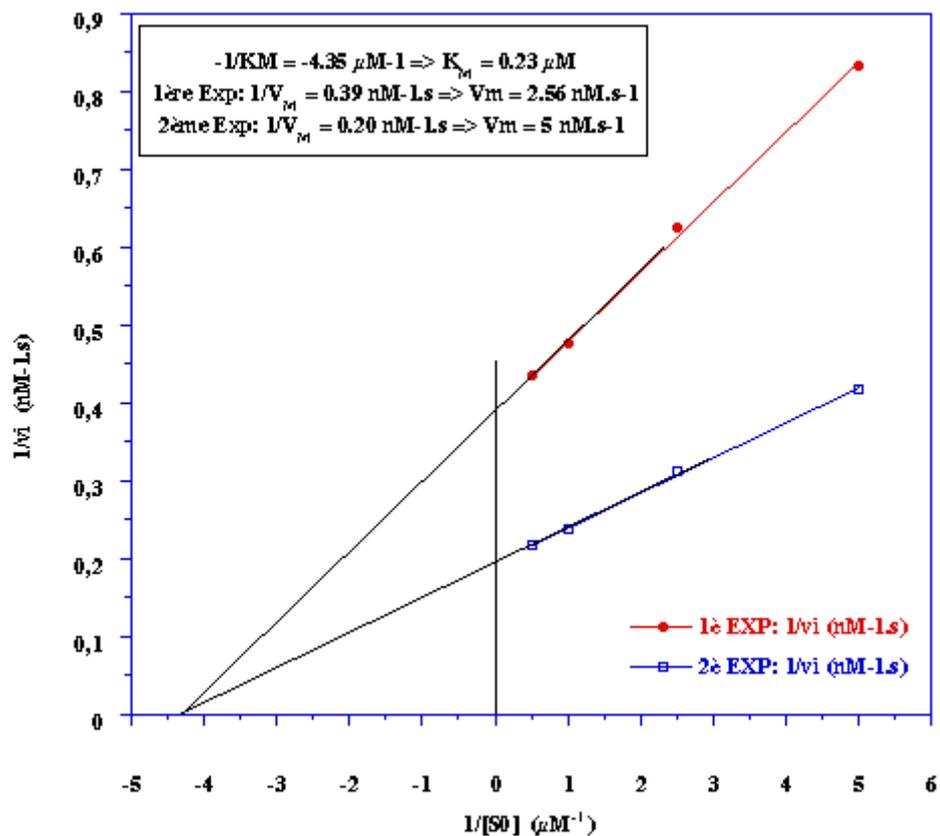
$$\text{L'activité spécifique est donc : } \text{A.S.} = V_{\text{Max}} / [E_0] = (0,137 \text{ unités.tube}^{-1}) / (2 \text{ mg.tube}^{-1}) = 68,5 \text{ mU.mg}^{-1}$$

Question N°4

Courbe de saturation



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



$$k_{\text{cat}}^{\text{Iso}} = V_{\text{max}}^{\text{Iso}} / [\text{Iso}]_0 = 2,56 \cdot 10^{-9} \text{ (M}\cdot\text{s}^{-1}) / 10 \cdot 10^{-12} \text{ (M)} \implies$$
$$k_{\text{cat}}^{\text{Iso}} = 256 \text{ s}^{-1} = 15360 \text{ min}^{-1}$$

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

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

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

