

## Série de Travaux Dirigés N° 3

(Réactions enzymatiques à deux substrats)

### Exercice N°1

Une enzyme catalyse une réaction selon un mécanisme ordonné. On mesure la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations de l'un des substrats (X) en maintenant fixe la concentration de l'autre substrat (Y), et inversement.

Les résultats, exprimés en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , sont les suivants :

| [X] (mM) | [Y] ( $\mu\text{M}$ ) |       |       |
|----------|-----------------------|-------|-------|
|          | 3                     | 5     | 10    |
| 0,33     | 0,017                 | 0,025 | 0,039 |
| 0,67     | 0,024                 | 0,033 | 0,038 |
| 5        | 0,034                 | 0,047 | 0,061 |

1. En n'utilisant que les deux représentations primaires, déterminer les paramètres cinétiques auxquels vous avez accès.
2. En déduire l'ordre de fixation des substrats. Quel paramètre cinétique n'est pas déterminé ?

### Exercice N°2

La **phospholipase A2** catalyse l'hydrolyse de l'acide gras estérifié en position 2 des 1-2-diacylphosphoglycérides en présence d'ion calcium. On mesure les vitesses initiales d'hydrolyse de la dibutyryl-lécithine (DBL), à différentes concentrations de ce substrat et de calcium.

La réaction est suivie en titrant l'acide libéré par la soude et les résultats, en  $\mu\text{moles d'acide libéré}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de phospholipase, sont les suivants :

| [DBL] (mM) | [Ca <sup>2+</sup> ] x 10 <sup>6</sup> (M) |      |      |      |
|------------|---|------|------|------|
|            | 25  | 50   | 100  | 200  |
| 11,4       | 0,60                                      | 0,83 | 1,00 | 1,15 |
| 22,7       | 1,07                                      | 1,40 | 1,70 | 1,85 |
| 34         | 1,45                                      | 1,85 | 2,15 | 2,35 |
| 45,4       | 1,75                                      | 2,20 | 2,50 | 2,70 |

1. Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction.
2. On étudie l'effet de l'acide butyrique (analogue de la DBL) et du baryum (analogue du calcium).

L'acide butyrique se comporte comme un inhibiteur compétitif de la DBL et comme un inhibiteur un-compétitif du calcium. Le baryum se comporte comme un inhibiteur compétitif du calcium et de la DBL. Ces résultats sont-ils en accord avec le précédent ?

### Exercice N°3

On étudie le mécanisme catalytique de la glycogène phosphorylase en mesurant les vitesses initiales de la réaction pour différentes concentrations des 2 substrats (le glycogène et le phosphate).

Les résultats, en  $\mu\text{moles de glucose 1-phosphate} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  glycogène phosphorylase, sont les suivants :

| [phosphate] x 10 <sup>3</sup> (M) | [glycogène] (mg.mL <sup>-1</sup> ) |      |    |      |      |
|-----------------------------------|------------------------------------|------|----|------|------|
|                                   | 3,2                                | 8    | 16 | 24   | 48   |
| 6                                 | 12                                 | 18   | 21 | 23   | 25   |
| 15                                | 24                                 | 35,5 | 43 | 46   | 49   |
| 30                                | 35,5                               | 53   | 64 | 68,5 | 74   |
| 45                                | 43                                 | 64   | 77 | 82   | 88   |
| 60                                | 47,5                               | 71   | 85 | 91,5 | 98,5 |

Écrire la réaction catalysée.

Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction.

### Exercice N°4

Une protéine kinase catalyse la réaction 1 : protéine substrat (inactive) + ATP ---> protéine substrat phosphorylée + ADP

La protéine substrat phosphorylée catalyse à son tour la réaction 2 : lipide C<sub>n</sub>:0 + malonyl-CoA ---> lipide C<sub>n</sub>+2:0

Le mécanisme de la réaction 2 est **ordonné**.

On mesure la vitesse initiale de la réaction 2 pour différentes concentrations des 2 substrats lipide Cn:0 et malonyl-CoA. Les résultats, exprimés en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , sont les suivants :

| lipide Cn:0 (mM) | [malonyl-CoA] ( $\mu\text{M}$ ) |       |       |
|------------------|---------------------------------|-------|-------|
|                  | 0,33                            | 0,67  | 5     |
| 3                | 0,017                           | 0,024 | 0,034 |
| 5                | 0,025                           | 0,033 | 0,047 |
| 10               | 0,039                           | 0,038 | 0,061 |

1. Déterminer les paramètres cinétiques auxquels on a accès en n'utilisant que les deux représentations primaires.
2. Déterminer l'ordre de fixation des substrats.
3. De quel paramètre cinétique ne détermine-t-on pas la valeur ?

### Exercice N°5

La galactose-1-phosphate uridylyltransférase catalyse la réaction : **UDP-glucose + galactose-1-phosphate  $\rightleftharpoons$  UDP-galactose + glucose-1-phosphate**

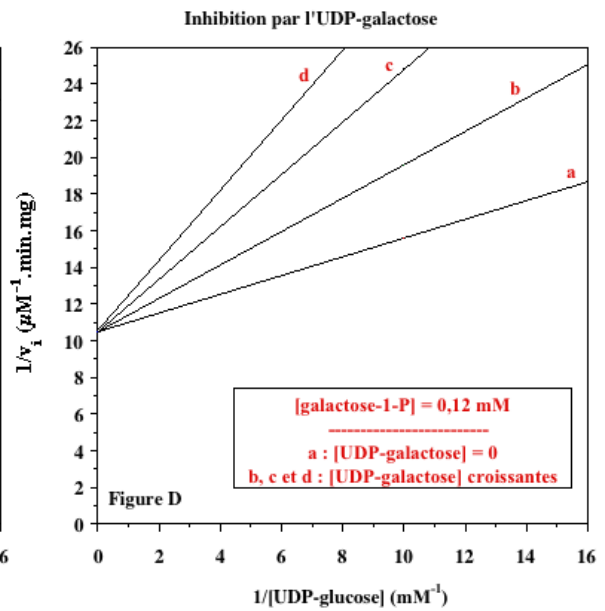
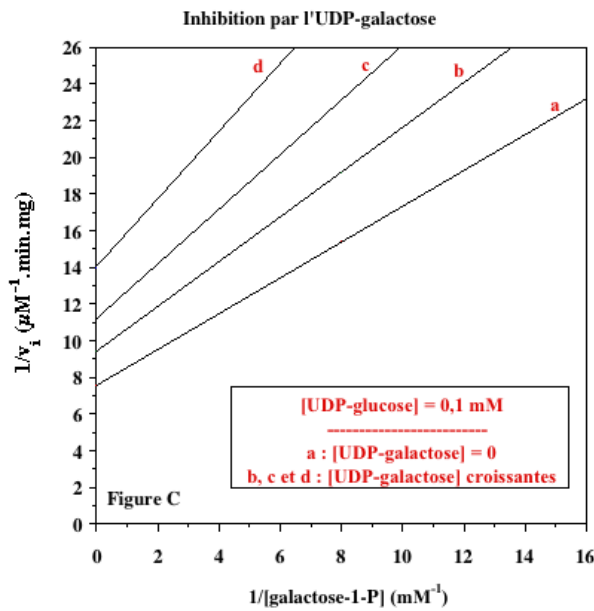
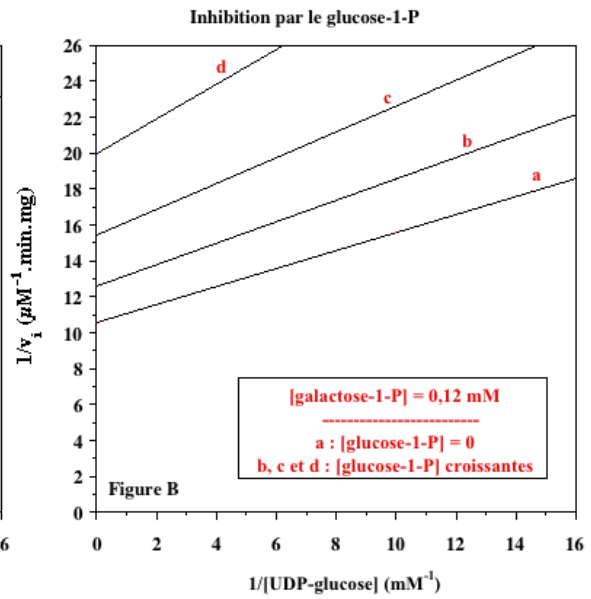
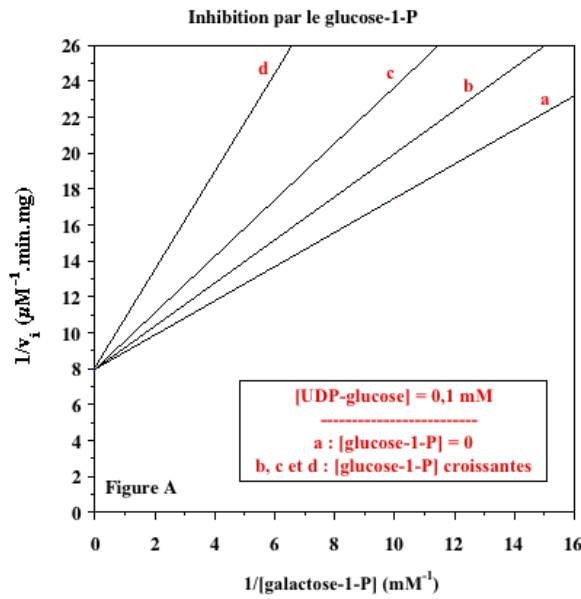
Le mécanisme de la réaction est **ordonné**.

On mesure la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations des 2 substrats UDP-glucose et galactose-1-phosphate. Les résultats, exprimés en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , sont les suivants :

| [UDP-glucose] ( $10^{-3}$ M) | [galactose-1-phosphate] ( $10^{-3}$ M) |       |       |       |
|------------------------------|--|-------|-------|-------|
|                              | 0,06                                   | 0,12  | 0,25  | 0,50  |
| 0,05                         | 0,034                                  | 0,048 | 0,061 | 0,069 |
| 0,10                         | 0,041                                  | 0,063 | 0,087 | 0,105 |
| 0,20                         | 0,046                                  | 0,075 | 0,111 | 0,143 |
| 0,50                         | 0,050                                  | 0,085 | 0,133 | 0,182 |

1. Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction.

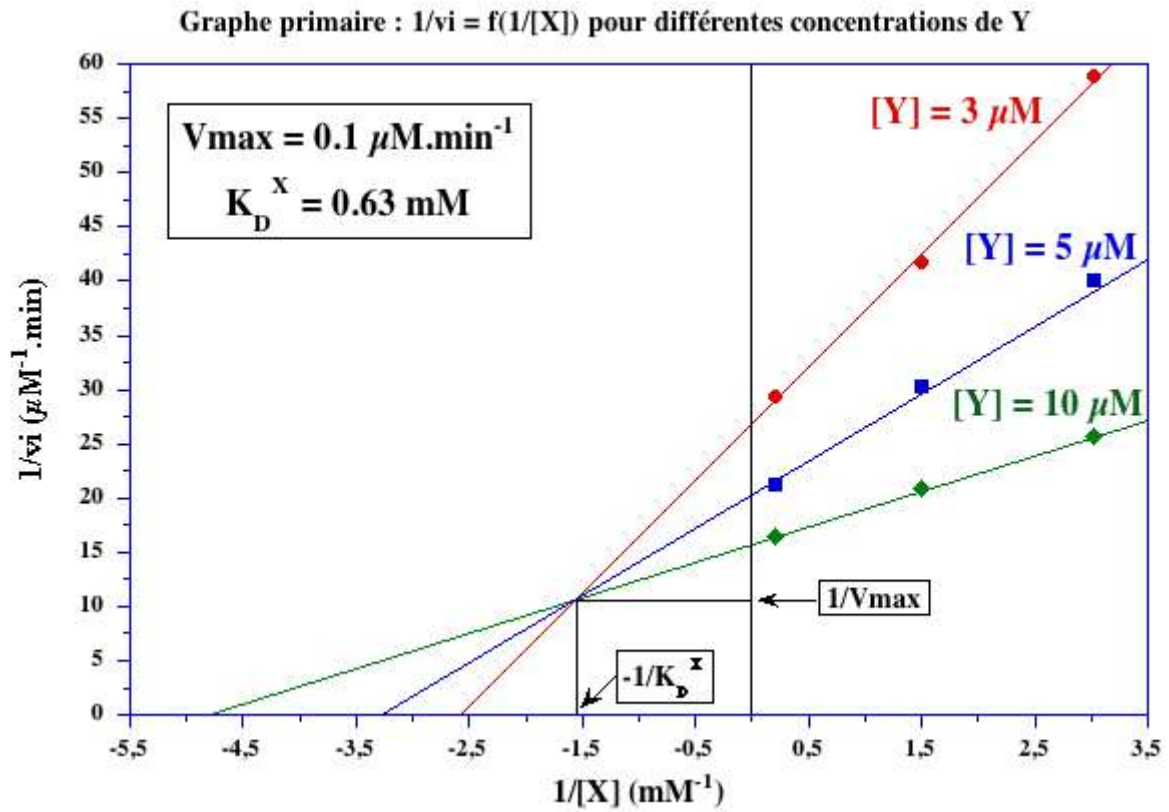
On étudie l'**effet inhibiteur des produits** de cette réaction, c'est-à-dire l'inhibition par le glucose-1-P (figures A et B, ci-dessous) et l'inhibition par l'UDP-galactose (figures C et D, ci-dessous).



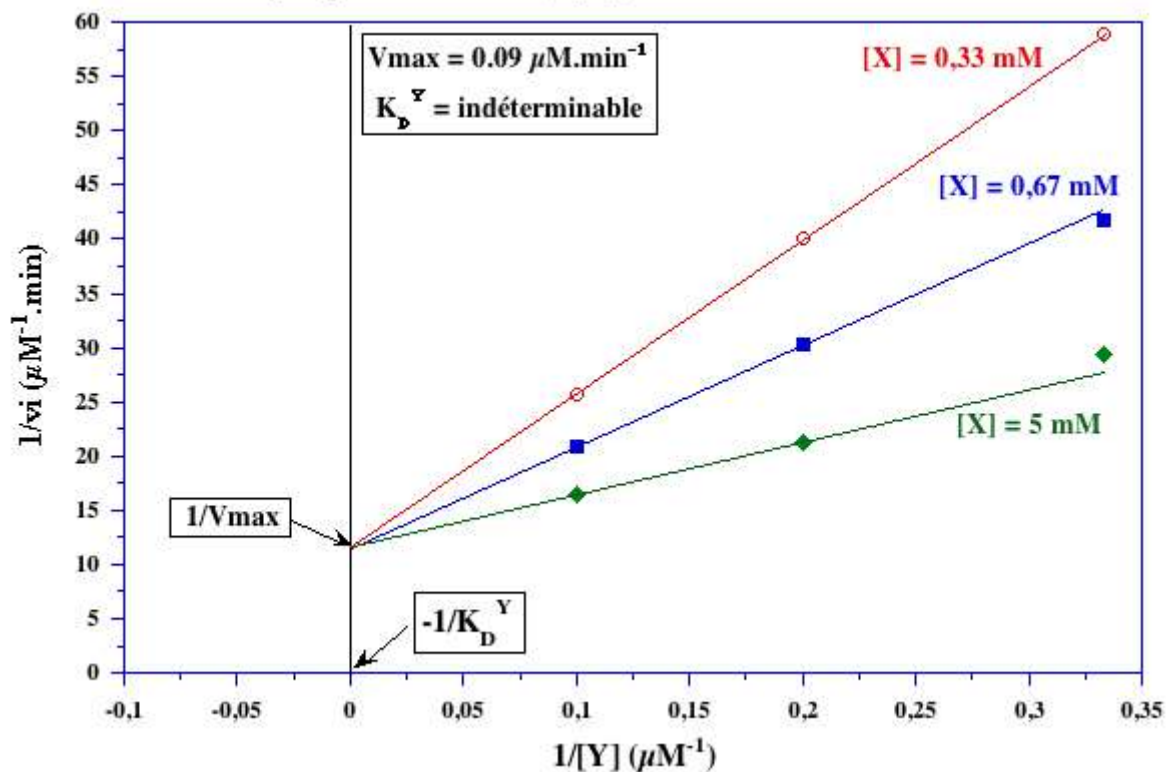
2. Les résultats sont-ils en accord avec le mécanisme déterminé ?
3. Quelle information supplémentaire apportent-ils ?
4. Proposer un schéma réactionnel compatible avec ces résultats.

# Correction TD 3

## Exercice N°1 – mécanisme ordonné



Graphes primaires :  $1/v_i = f(1/[Y])$  à concentrations fixes de X.



$$1/V_{\text{Max}} = 10 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min} \Rightarrow V_{\text{Max}} = 0,1 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$1/K_D^Y = 0$  (point de concourance sur l'axe des ordonnées)  $\Rightarrow K_D^Y = \text{infini}$   
 $\Rightarrow Y$  ne peut pas se fixer sur l'enzyme libre.

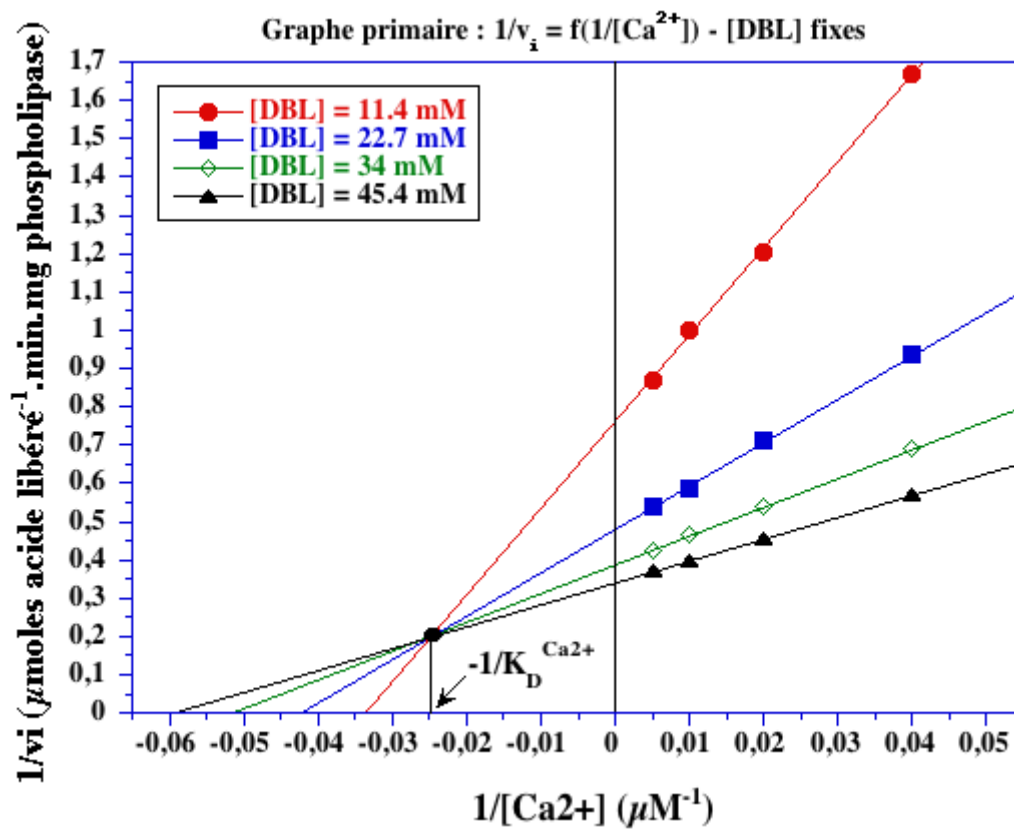
C'est donc un **mécanisme ordonné** avec Y en second.



*E. Jaspard (2017)*

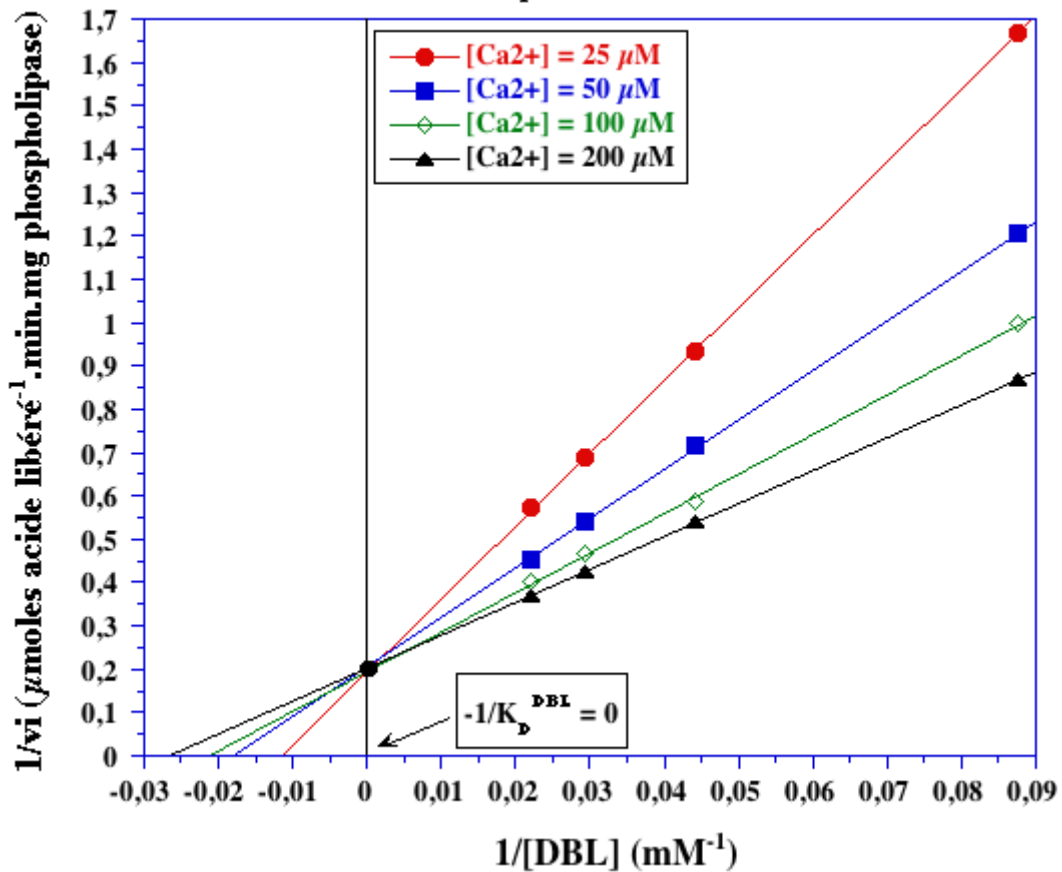
## Exercice N°2 : Mécanisme ordonné calcium - DBL et inhibiteurs

### 1. Graphes primaires



$$K_D^{Ca^{2+}} = 41,7 \mu\text{M}$$

Graphe primaire:  $1/v_i = f(1/[DBL]) - [Ca^{2+}]$  fixes



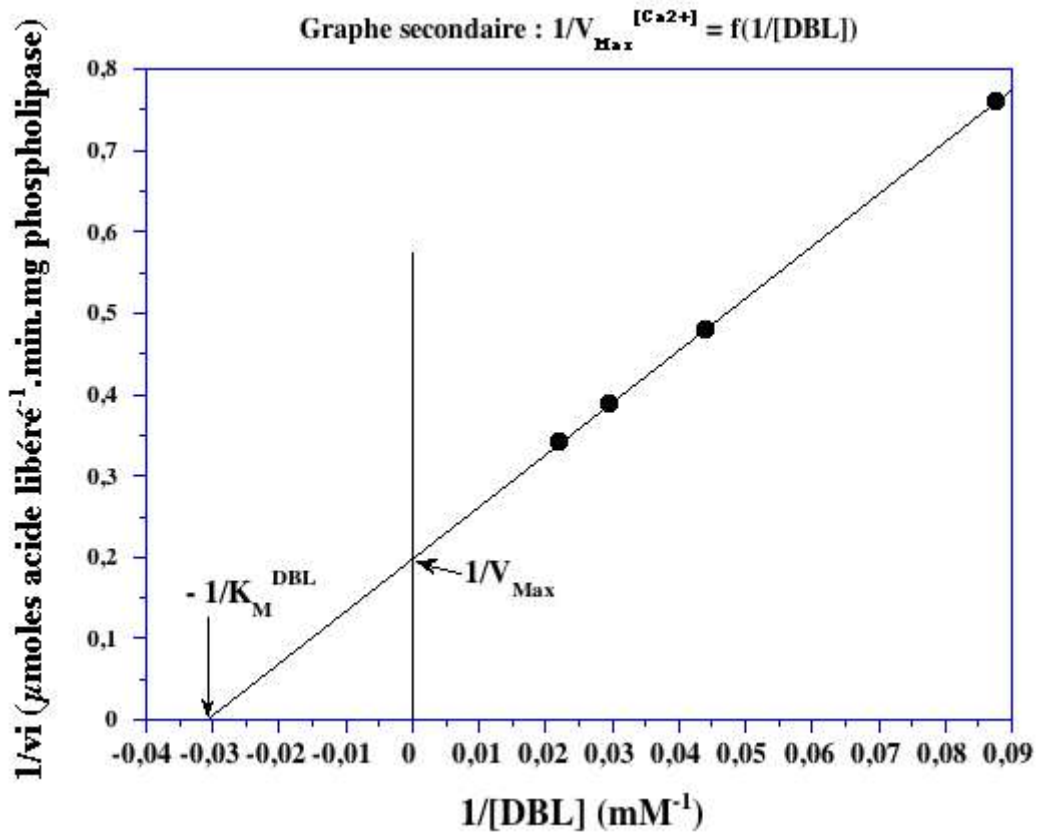
$1/K_D^{DBL} = 0$  (point de concurrence sur l'axe des ordonnées)  $\Rightarrow K_D^{DBL} = \infty \Rightarrow$  DBL se fixe en second.

## 2. Graphe secondaire

A partir du graphe primaire pour le calcium (ci-dessus), on obtient les valeurs du tableau ci-dessous qui permettent de tracer le graphe secondaire pour la DBL (ci-dessus) :

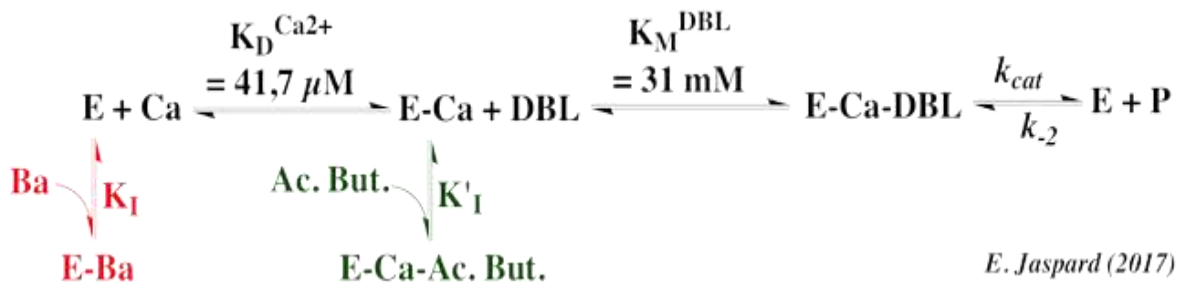
| [DBL] (mM) | $1/[DBL]$ (mM <sup>-1</sup> ) |
|------------|-------------------------------|
| 11,4       | 0,088                         |
| 22,7       | 0,044                         |
| 34         | 0,029                         |
| 45,4       | 0,022                         |





$1/V_{\text{Max}} = 0,2 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}$  et  $-1/K_M^{\text{DBL}} = 0,032 \text{ mM}^{-1} \Rightarrow V_{\text{Max}} = 5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  et  $K_M^{\text{DBL}} = 31 \text{ mM}$ .

Il s'agit d'un mécanisme **ordonné**.

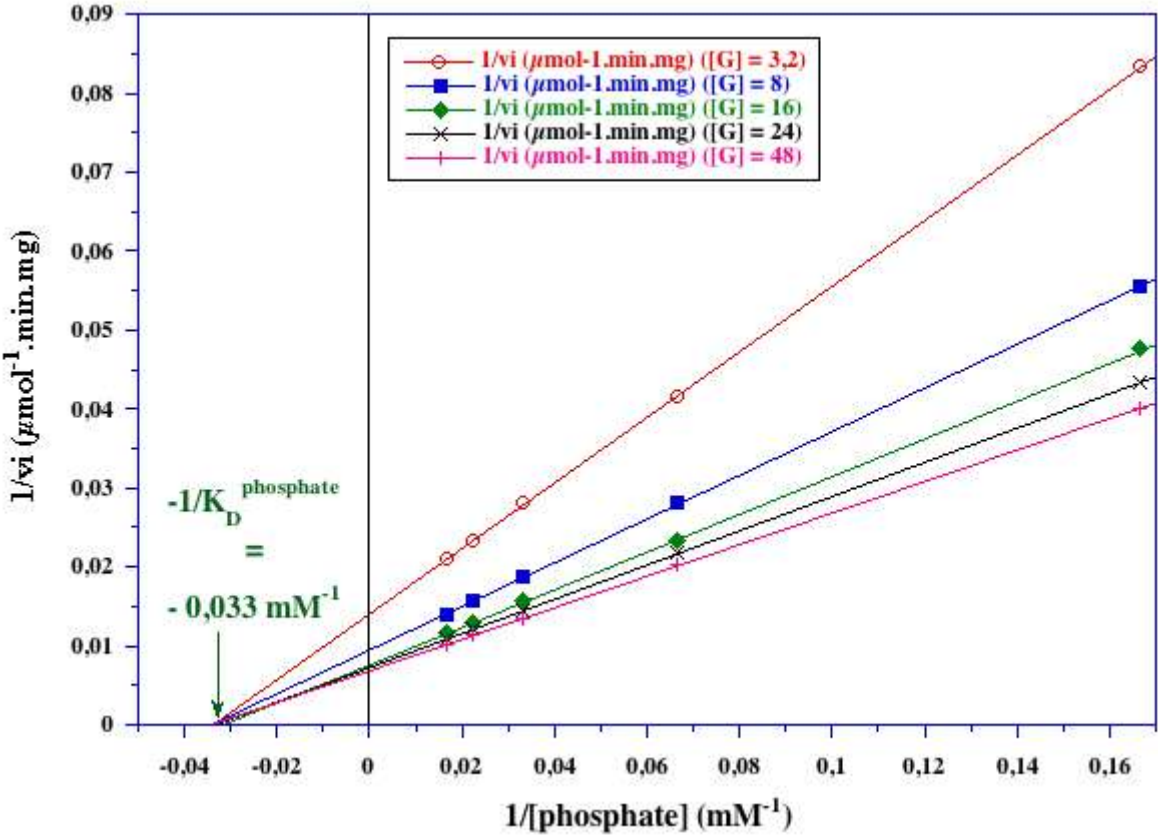


### 3. Effet des inhibiteurs : baryum et acide butyrique

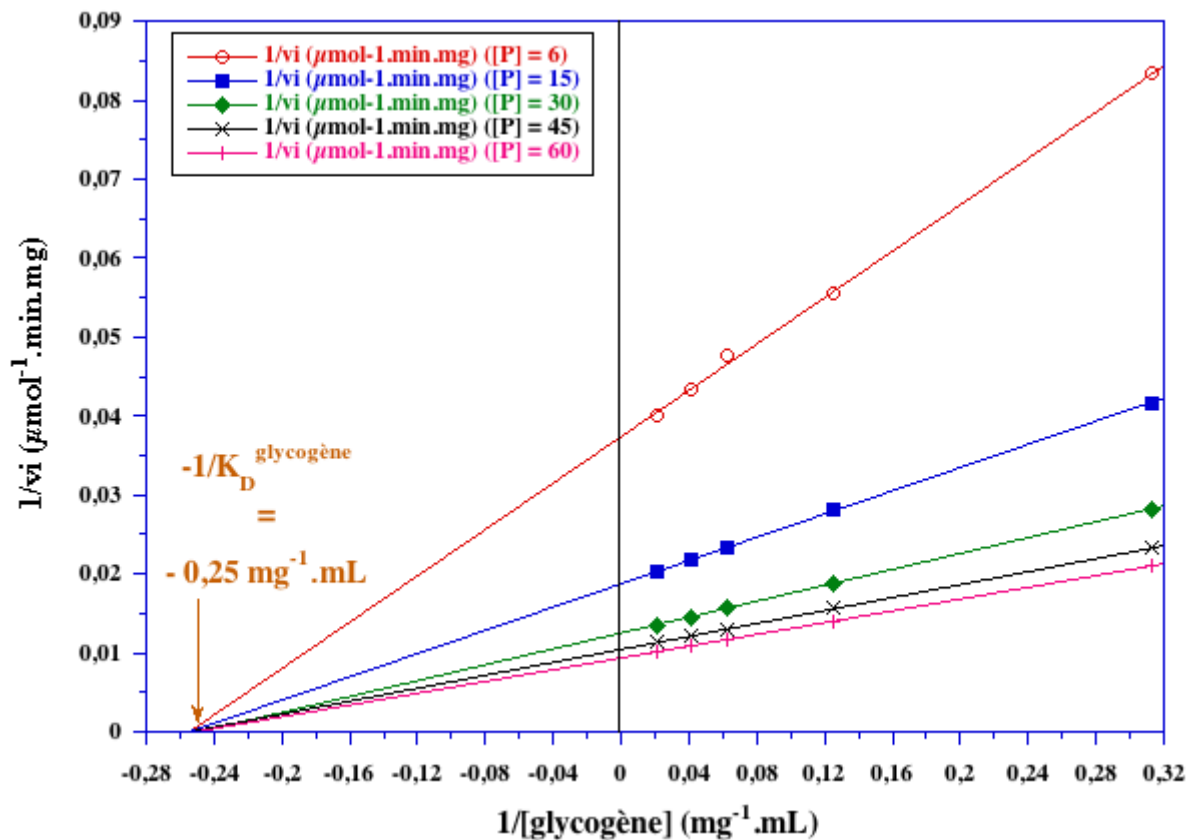
| inhibiteur                 | 1er substrat : $\text{Ca}^{2+}$  | 2ème substrat : DBL  |
|----------------------------|--|--|
| baryum                     | <b>Compétitif</b> pour le $\text{Ca}^{2+}$ : fixation sur la forme libre E | Puisque compétitif pour le $\text{Ca}^{2+}$ , alors forcément <b>compétitif</b> pour DBL |
| acide butyrique (Ac. but.) | <b>Incompétitif</b> : fixation sur E-Ca (qui est une forme ES)             | <b>Compétitif</b> : fixation de Ac. but. sur E-Ca qui est une forme libre pour DBL       |

Exercice N°3 : Mécanisme au hasard - glycogène - phosphate

1. Graphes primaires



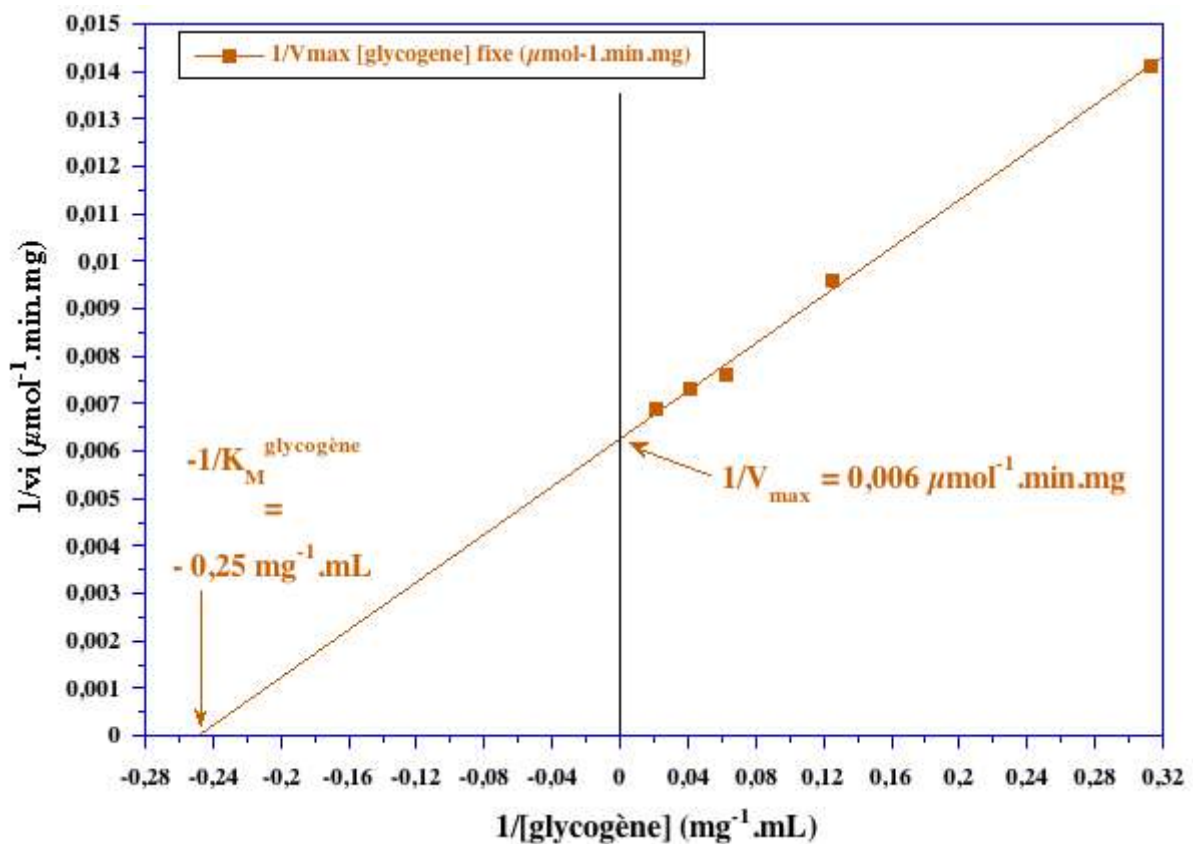
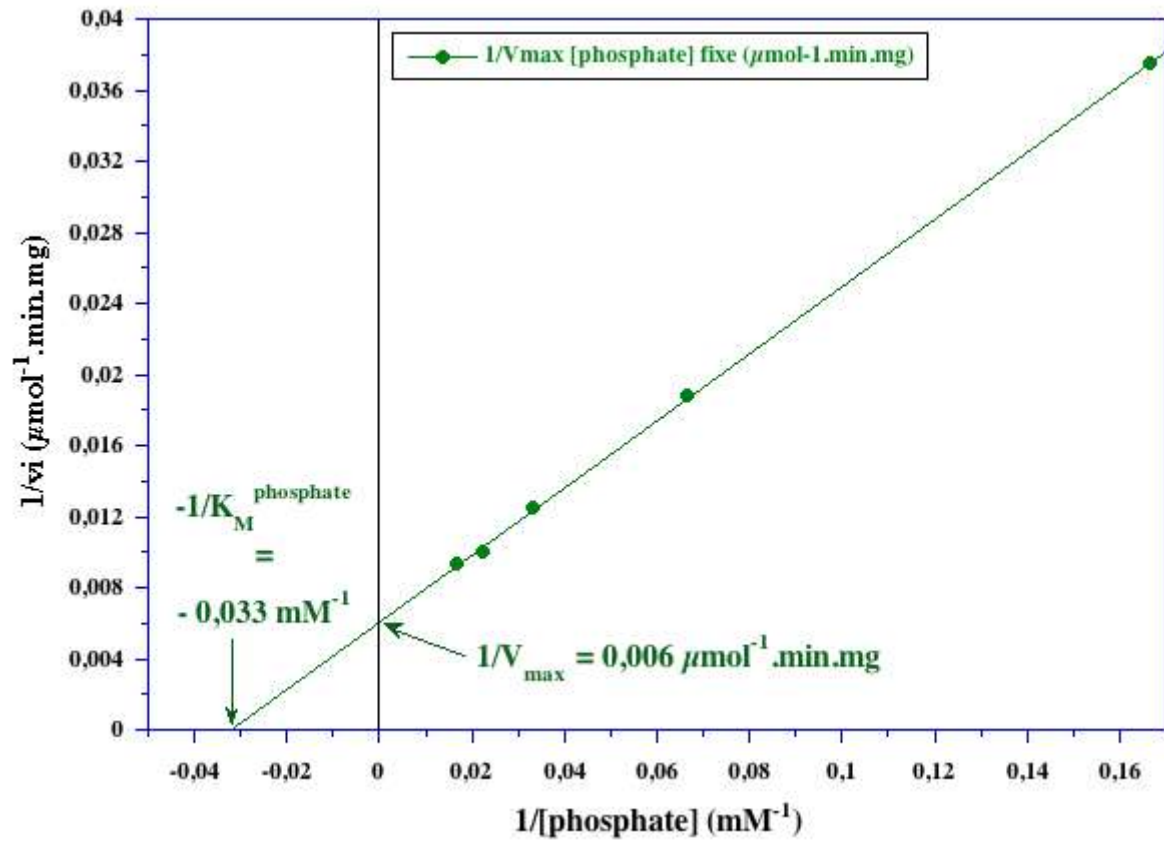
$K_D^{\text{phosphate}} \approx 30 \text{ mM}$



$$K_D^{\text{glycogène}} = 4 \text{ mg.ml}^{-1}$$

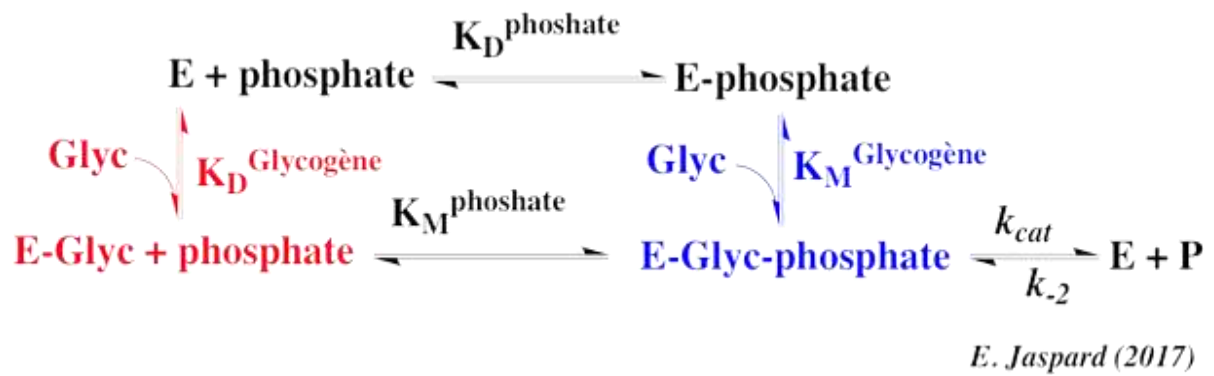
## 2. Graphes secondaires

| valeurs issues du graphe primaire pour le phosphate |   | valeurs issues du graphe primaire pour le glycogène |   |
|---|---|---|---|
| [glycogène] (mg.mL <sup>-1</sup> )                  | 1/V <sub>max</sub> <sup>[glycogène]</sup> <sub>fixe</sub> (μmol <sup>-1</sup> .mn.mg) | [phosphate] (mM)                                    | 1/V <sub>max</sub> <sup>[phosphate]</sup> <sub>fixe</sub> (μmol <sup>-1</sup> .mn.mg) |
| 3,2   | 0,0141  | 6   | 0,0375  |
| 8   | 0,0096  | 15  | 0,0188  |
| 16  | 0,0076  | 30  | 0,0125  |
| 24  | 0,0073  | 45  | 0,0100  |
| 48  | 0,0069  | 60  | 0,0094  |



$V_{\text{Max}} \approx 167 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  ;  $K_M^{\text{phosphate}} \approx 30 \text{ mM}$  ;  $K_M^{\text{glycogène}} = 4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

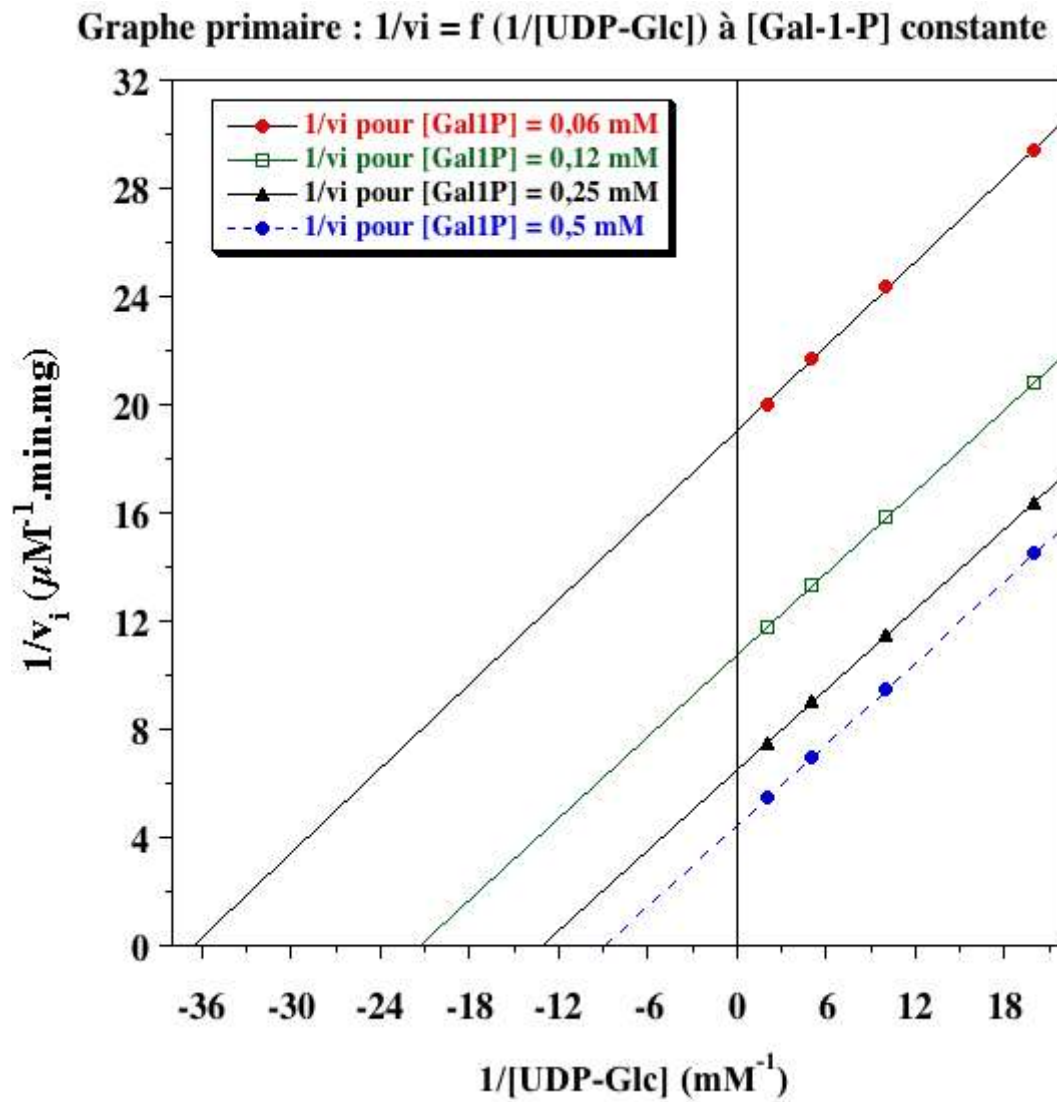
Il s'agit d'un mécanisme réactionnel **au hasard**.



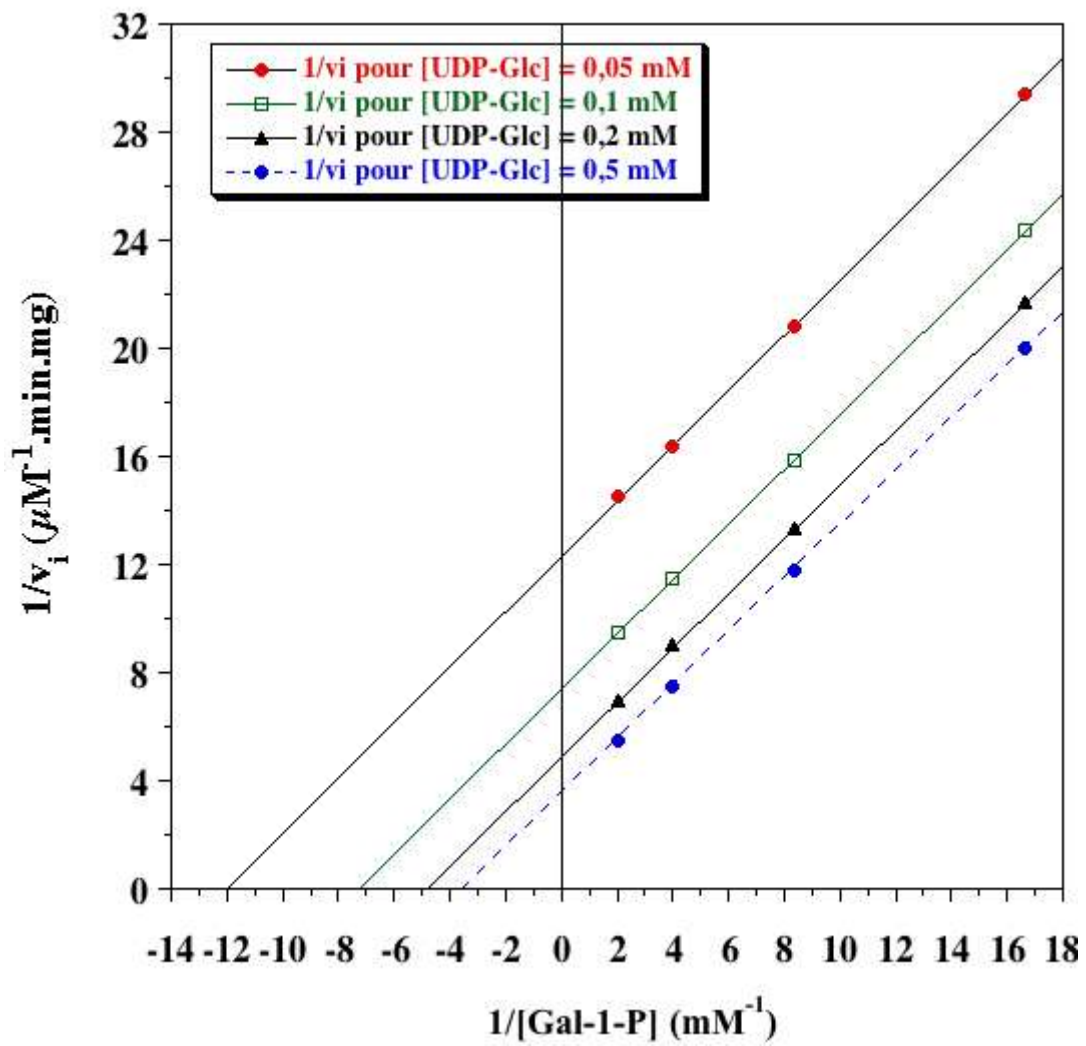
Il s'agit d'un **schéma carré** puisque  $K_D^{\text{phosphate}} = K_M^{\text{phosphate}}$  et  $K_D^{\text{glycogène}} = K_M^{\text{glycogène}}$ .

## Exercice N°5 - mécanisme ping-pong

### 1. Graphes primaires

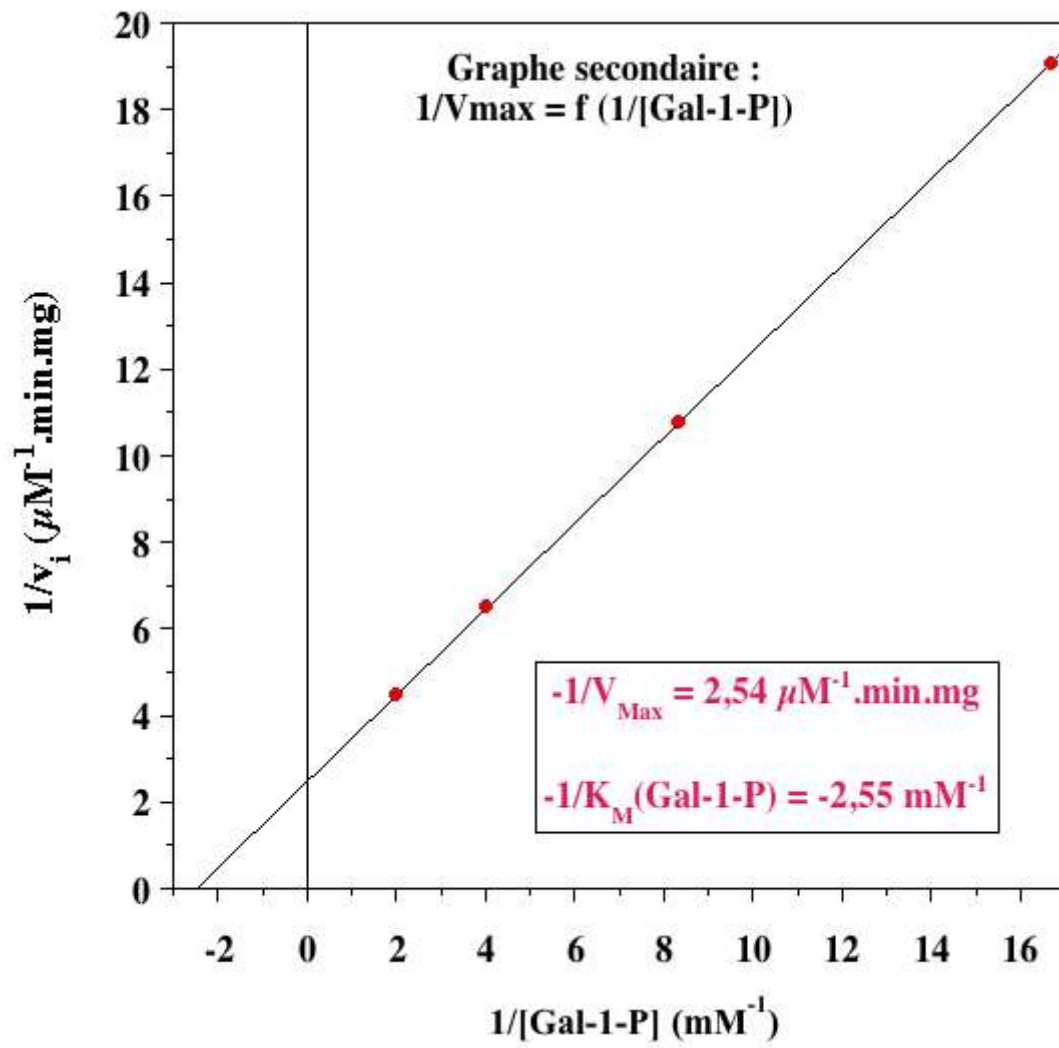


Graphe primaire :  $1/v_i = f(1/[Gal-1-P])$  à  $[UDP-Glc]$  constante

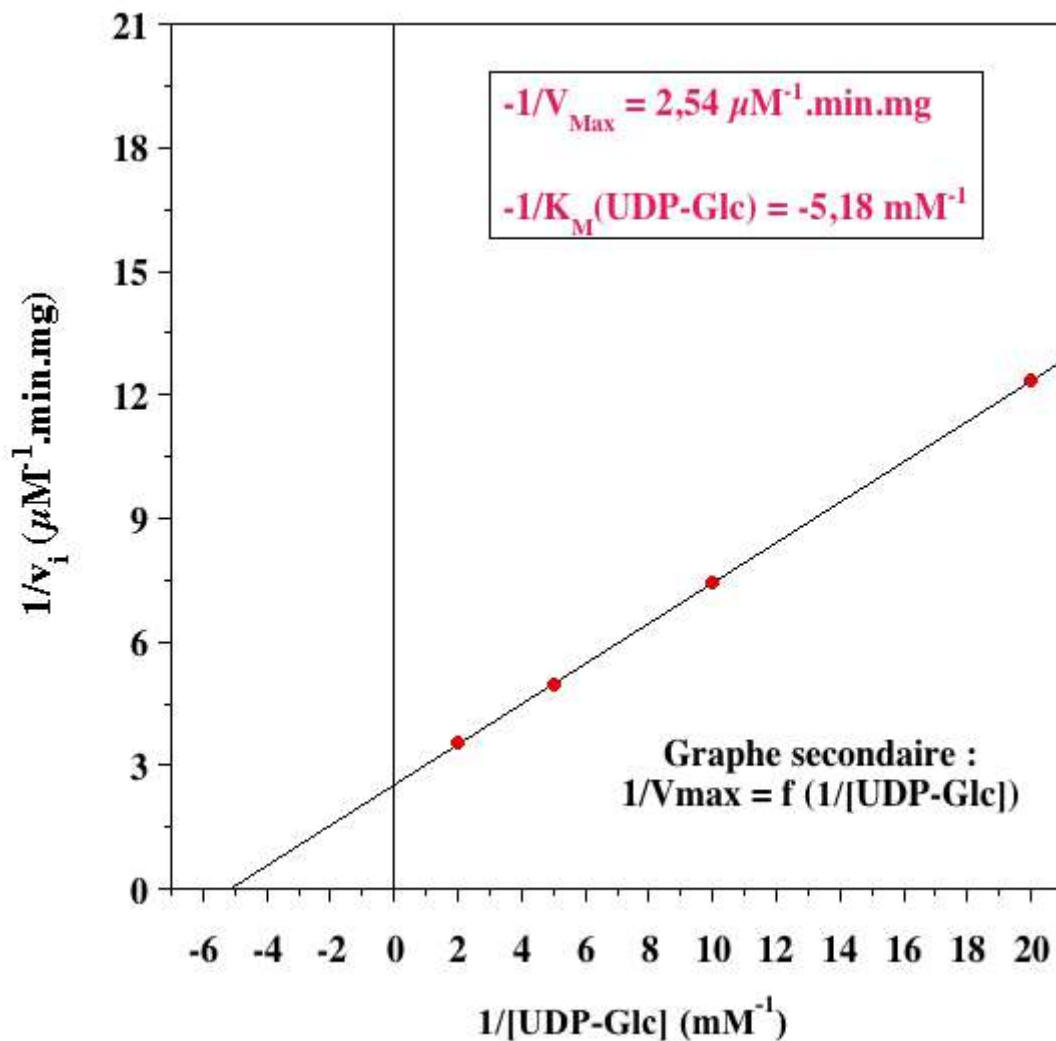


L'ensemble de droites parallèles indique un [mécanisme ping-pong](#).

## 2. Graphes secondaires





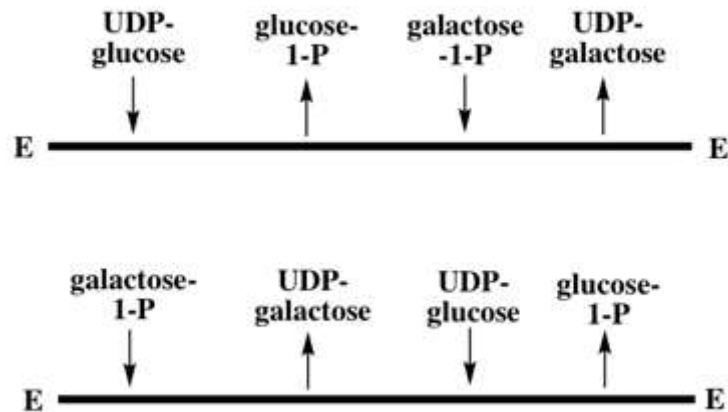


$V_{\text{Max}} = 0,39 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$   
 $K_M^{\text{galactose-1-P}} = 0,39 \text{mM}$   
 $K_M^{\text{UDP-glucose}} = 0,19 \text{mM}$

| Effet des inhibiteurs (voir l'énoncé) |                |                |
|---------------------------------------|----------------|----------------|
|                                       | UDP-glucose    | Galactose-1-P  |
| UDP-galactose                         | Compétitif     | Non compétitif |
| Glucose-1-P                           | Non compétitif | Compétitif     |

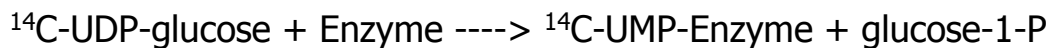
Le schéma du bas de la figure ci-dessous impose une hypothèse supplémentaire : en effet, l'UDP galactose peut difficilement être synthétisé à partir du galactose-1-P sans apporter l'UDP comme substrat.

2 schémas de type ping-pong possibles



*E. Jaspard (2014)*

Une **expérience supplémentaire** est donc effectuée : en utilisant du  $^{14}\text{C}$ -UDP-glucose à concentration saturante, en absence de galactose-1-P, le  $^{14}\text{C}$ -UMP se fixe de façon **covalente** sur l'enzyme.



Cette réaction démontre la validité de la 1ère partie du schéma du haut ou la 2nde partie du schéma du bas.

On suit aussi la libération de glucose-1-P. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

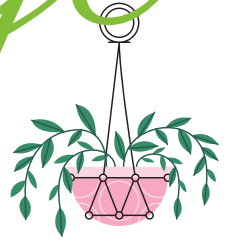
| E ( $\mu\text{M}$ ) | $^{14}\text{C}$ -UMP incorporé sur l'enzyme ( $\mu\text{M}$ ) | glucose-1-P ( $\mu\text{M}$ ) |
|---------------------|---|-------------------------------|
| 6                   | 6,1   | 6,2                           |
| 6                   | 5,9   | 5,8                           |
| 2                   | 1,9   | 1,8                           |
| 2                   | 2,1   | 2,2                           |

D'après ces résultats, on obtient des quantités équimolaires pour les 2 substrats (UDP-glucose et glucose-1-P).

Le **schéma du haut est donc correct** : l'enzyme doit être sous la forme libre E pour fixer l'UDP-glucose.

En revanche, l'enzyme devrait être sous la forme **E-UMP** pour libérer l'UDP-galactose comme dans le schéma du bas.

# 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

