

ENZYMOLOGIE APPROFONDIE

EXERCICES DE REVISION

Cinétique enzymatique à un substrat

Inhibition enzymatique

2024/2025

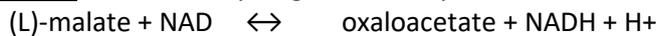
Travaux dirigés d'enzymologie

Loi de Michaelis-Menten :

Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique

On représente la disparition du substrat ou l'apparition du produit en fonction du temps à l'aide d'un papier millimétré.

Exercice 1. Malate déshydrogénase catalyse la réaction:



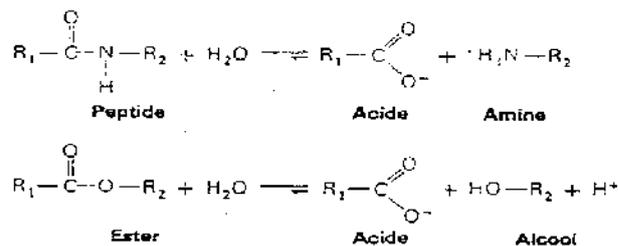
The rate of the forward reaction was investigated in the presence of saturating concentrations of malate and a fixed concentration of enzyme. The following results were obtained:

NAD+ Conc (mmol·l ⁻¹)	Absorbance (at 340nm) at time t (minutes)					
	t=0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
1.5	0.033	0.056	0.079	0.102	0.122	0.138
2.0	0.036	0.063	0.089	0.116	0.138	0.154
2.5	0.040	0.069	0.099	0.128	0.150	0.168
3.33	0.043	0.075	0.108	0.140	0.163	0.175
5.0	0.047	0.084	0.121	0.158	0.177	0.184
10.0	0.052	0.095	0.137	0.180	0.192	0.200

Find the initial velocity at each concentration and Calculate K_M and V_{max}

Exercice 2 : Effet de la concentration en enzyme

La chymotrypsine est une enzyme sécrétée par le pancréas qui catalyse l'hydrolyse des protéines. Elle ne clive pas toutes les liaisons peptidiques à une vitesse significative. Bien au contraire, elle est sélective des liaisons peptidiques du côté carboxylique des chaînes latérales aromatiques de la tyrosine, du tryptophane et de la phénylalanine. La chymotrypsine hydrolyse aussi les liaisons esters.



Afin d'étudier la dépendance de la vitesse de la réaction enzymatique vis à vis de deux substrats, deux études cinétiques ont été réalisées. La réaction d'hydrolyse du N-acetyl-tyr ethyl ester a été suivie par titrimétrie, celle du N-acetyl-L-Trp-p-nitrophenol par spectroscopie optique.

1. Par spectroscopie optique, 30 μL d'une solution de protéine à 15 mg/L sont ajoutés à une série de milieux réactionnels de 3 mL contenant différentes concentrations en substrat. On mesure en fonction du temps l'absorbance à 410 nm du produit obtenu. ($\epsilon^M = 8800 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Concentration initiale en ester $\times 10^3$ (M)	Absorbance à 410 nm			
	Temps (min)			
	0.5	1	2	3
0.5	0.01	0.02	0.036	0.04

1	0.016	0.033	0.066	0.08
2	0.024	0.049	0.098	0.13
5	0.035	0.07	0.14	0.20
20	0.042	0.084	0.168	0.25

- a) Déterminer les vitesses initiales de la réaction pour les différentes concentrations en substrat. Déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme.
- b) Par le calcul, déterminez les vitesses initiales de la réaction pour les concentrations en substrats suivantes: 0,05 mmol/L, 2 mmol/L et 1 mol/L.
- c) Quelles seront les concentrations en substrat après 30 minutes et après 5 heures de réaction pour les concentrations initiales de substrat 0,75 mol/L et 0,05 mmol/L?

Quand on refait les expériences en utilisant le N-acetyl-L-Trp-p-nitrophenol avec différents volumes de solution de protéine à 15 mg/L, on obtient les résultats suivants :

Concentration initiale de substrat $\times 10^3$ (M)	Vitesse initiale de réaction ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	
	Volume de protéine	
	50 μL	75 μL
0,5	3.8	5.7
2	9.3	13.9
20	15.9	23.8

- d) A partir de ces résultats, déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme dans ces différentes conditions. En déduire la relation entre la vitesse de la réaction et les concentrations en enzyme.
- e) Que deviendront donc les valeurs de V_m , K_m et v si les expériences sont réalisées avec 3 fois plus d'enzyme?

2. Par titrimétrie. 20 μL d'une solution de protéine à 1,25 mg/mL sont ajoutés à une série de milieux réactionnels de 10 mL contenant différentes concentrations en substrat. On évalue en fonction du temps le volume de soude (0.05M) versé pour maintenir le pH à 8.

Concentration initiale en ester $\times 10^3$ (M)	Volume de soude (μL)			
	Temps (min)			
	0.5	1	2	3
0.5	4	8	16	20
1	6	12	24	32
2	8	16	32	46
5	10	20	40	60
20	11	23	46	69

Déterminer les vitesses initiales de la réaction pour les différentes concentrations en substrat. Déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme.

3. Dans les deux cas :

- a) Calculer l'activité spécifique de l'enzyme.
- b) Sachant que l'enzyme utilisée est pure et que sa masse molaire est 25000 g/mol, déterminer son activité moléculaire.
- c) Quel substrat l'enzyme hydrolyse-t-elle le mieux?

Exercice 3

Pour étudier la dépendance de la vitesse d'une réaction enzymatique vis à vis des concentrations en substrat et en enzyme, on ajoute 30 μL d'une solution de protéine à 2,6 mg/L à une série de milieux réactionnels de 3 mL contenant différentes concentrations en substrat. On évalue en fonction du temps la concentration en produit formé. On observe les résultats suivants:

[Substrat] ₀ 10^3 (M)	Concentration en produit ($\mu\text{mol/L}$)				
	Temps (min)				
	5	10	20	30	40
1	8	14	24	32	41
2	14	33	42	56	72
5	29	54	85	110	132
11	41	82	148	185	210
50	58	115	230	350	455

Les expériences sont réalisées avec différents volumes de solution de protéine à 2,6 mg/L, les résultats obtenus sont les suivants:

[Substrat] ₀ 10^3 (M)	Vitesse initiale de réaction ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	Volume de protéine		
	30 μL	50 μL	75 μL

1	1,62	2,7	4,0
11	8,22	13,7	20,5
50	11,6	19,3	29

- A partir de ces résultats, déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme.
- Par le calcul, déterminer les vitesses initiales de la réaction pour 30 μL de solution de protéine et pour les concentrations en substrats suivantes: 0,2 mmol/L; 6 mmol/L et 1 mol/L.
- Quelles seront les concentrations en substrat après 30 minutes et après 5 heures de réaction pour les concentrations initiales de substrat 0,75 mol/L et 0,1 mmol/L?
- Calculer les concentrations en substrat nécessaires pour avoir des vitesses initiales de réaction égales à 10, 15, 90 et 95 % de V_m ? Que remarquez-vous?
- Que deviendront les valeurs de V_m , K_m et v si les expériences sont réalisées avec 3 fois plus d'enzyme?
- Calculer l'activité spécifique de l'enzyme.
- Sachant que l'enzyme utilisée est pure et que sa masse molaire est 50 000 g/mol, déterminer son activité moléculaire.
- Dans un test de mesure identique, avec une concentration saturante en substrat, 20 μL d'une solution à 8 mg/L de protéine d'une préparation brute de cette enzyme renferment 6×10^{-2} UI. Quelle est la pureté de la préparation utilisée?

Exercice 4

L'invertase catalyse la réaction d'hydrolyse du saccharose :



a) On veut déterminer l'influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de la réaction: on ajoute à un mélange comprenant 1 mL de tampon pH 7,0 et 1 mL de substrat à concentration saturante, 1 mL de solution d'invertase pure de concentration variable. On mesure la quantité de produit (glucose) apparu en fonction du temps :

[E] ₀ (10 ⁻⁶ M)	Glucose (μ mole)							
	temps (min)							
	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
1	0,8	1,5	2,5	3,3	4,1	5,0	5,8	6,6
3	2,9	5,8	8,7	11,5	14,4	16,8	18,4	19,5
5,6	5,0	10,0	15,0	17,8	19,5	21,0	21,7	22,0

- Tracer les courbes $P = f(t)$ et les commenter.
 - Calculer la vitesse initiale v_i exprimée en μ moles de glucose apparues par min pour chaque concentration d'enzyme. Tracer la courbe $v_i = f([E])$ et donner vos interprétations des résultats.
 - Calculer le k_{cat} de l'invertase ainsi que son activité spécifique sachant que sa masse molaire est de 250 000 g/mole.
- 4) On a réalisé une mesure de l'activité de l'invertase à partir d'un extrait cellulaire et on a obtenu 3,6 μ moles de glucose en 4 min. L'extrait cellulaire (100mL) contient 300 mg de protéines. Calculer :
- l'activité de 1 mL d'extrait
 - la concentration molaire d'invertase de cet extrait
 - le % en masse d'invertase dans les protéines de l'extrait
- b) On veut déterminer l'influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction : on ajoute à un mélange comprenant 1 mL de tampon pH 7,0 et 1 mL d'invertase de concentration identique, 1 mL de solution de saccharose de concentration variable. On mesure la vitesse initiale de la réaction pour les différentes concentrations de substrat :

(S) ₀ (10 ⁻² M)	v_i (μ moles de glucose apparues/ min)
1	0,36
2	0,6
3	0,8
4	0,92
10	1,28
15	1,4

- Tracez la courbe $v_i = f([S])$. Commenter cette courbe et déterminer à l'aide d'une représentation fiable V_m et K_m .
- Quelle est l'activité de 1 mL de la solution d'invertase?
- Déterminer la concentration molaire de cette solution d'enzyme.

Inhibition de l'activité enzymatique :

Bien vouloir réviser le cours sur l'inhibition enzymatique : compétitive (V_{max} et K_m , K_i), Incompétitive (V_{max} , K_m et K_i), Mixte (V_{max} , K_m et K_i et K_i') ainsi que les tracés, et appliquer sur les exercices suivants.

Exercice 5

On suit la cinétique d'hydrolyse de l'orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) par la β-galactosidase, respectivement en absence d'inhibiteur et en présence d'orthonitrophényl-β-D-thiogalactopyranoside (ONPTG), de maltose (α-D-glucopyranosyl-(1,4)-β-D-glucopyranose) ou de mélibiose (α-D-galactopyranosyl-(1,6)-α-D-glucopyranose).

Les valeurs des vitesses initiales obtenues en suivant la variation de l'absorbance à $\lambda = 410 \text{ nm}$ sont les suivantes :

$[S]_0 (M)$	$\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$			
	Sans I	[ONPTG] $3 \cdot 10^{-4} M$	[maltose] $0,26 M$	[mélibiose] $0,17 M$
0	0	0	0	0
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,033	0,018	0,016	0,027
$5 \cdot 10^{-5}$	0,055	0,033	0,027	0,041
$1 \cdot 10^{-4}$	0,082	0,055	0,041	0,055
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,118	0,091	0,059	0,069
$5 \cdot 10^{-4}$	0,138	0,118	0,069	0,075
$1 \cdot 10^{-3}$	0,150	0,138	0,075	0,079

- Que suit-on à $\lambda = 410 \text{ nm}$? Déterminer V_m , K_m et k_{cat} (en s^{-1}) à l'aide de la représentation de votre choix.
- Déterminer les paramètres cinétiques V_m^{app} et K_m^{app} en présence des inhibiteurs.
- Calculez les constantes K_i .
- Expliquer le type d'inhibition observé pour chacun des inhibiteurs de cet exercice. Données: $[E]_0 = 1,19 \cdot 10^{-9} M$; $\epsilon_M = 3300 M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $l = 1 \text{ cm}$

Exercice 6

L'étude préliminaire de l'activité d'une enzyme en absence et en présence d'un inhibiteur donne les résultats suivants :

$[S]_0 (mM)$	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0	2.0	4.0
$v_i (\mu M \cdot \text{min}^{-1})$ sans I	16.5	25.5	32.0	38.5	46.5	52.6	55.5
$v_i (\mu M \cdot \text{min}^{-1})$ avec I	13.5	18.8	22.2	25.6	29.2	31.1	32.4

- Tracer les courbes de saturation et les représentations de Lineweaver-Burk. Quelles conclusions pouvez-vous en tirer?
- Dans le cas d'un inhibiteur incompétitif, dans quelle partie de la courbe de saturation (en d'autres termes, pour quelle gamme de concentrations de substrat), cet inhibiteur est-il le plus efficace?

Exercice 7

On veut caractériser une enzyme que l'on vient de purifier. Pour cela on effectue une série d'expériences au cours desquelles on détermine la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en substrat et en présence d'un inhibiteur X à la concentration de $10^{-4} M$ d'une part et d'un inhibiteur Y à la même concentration d'autre part.

Pour chaque expérience, on utilise $10 \mu\text{l}$ de solution enzymatique dont la teneur en protéine est de $2,3 \text{ g/L}$. Les vitesses de réaction sont exprimées en μmoles de substrat transformées par minute.

$[S] \cdot 10^5 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	50	20	10	7	5
v en présence de X	10,87	7,13	4,59	3,52	2,65
v en présence de Y	12,50	7,13	4,16	3,09	2,29

L'enzyme pure cristallisée a une masse molaire de $125\,000 \text{ g/mole}$ et son activité moléculaire est de $175\,000 \text{ min}^{-1}$. A partir de ces résultats expérimentaux, déterminer le maximum de caractéristiques de l'enzyme en relation avec

v_{ONapp}

substrat et ses inhibiteurs sachant que la valeur du K_m en absence d'inhibiteur est égale à celle du K_m l'inhibiteur Y en présence de

Exercice 8

Les mesures d'activité d'une enzyme en absence et en présence d'une substance A à la concentration de $5 \times 10^{-6} M$ ont donné les résultats suivants:

$[S] (mM)$	vitesse de réaction ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	
	en l'absence de A	en présence de A
0,13	0,35	0,25
0,16	0,40	0,28
0,20	0,46	0,31
0,26	0,54	0,34
0,40	0,67	0,39

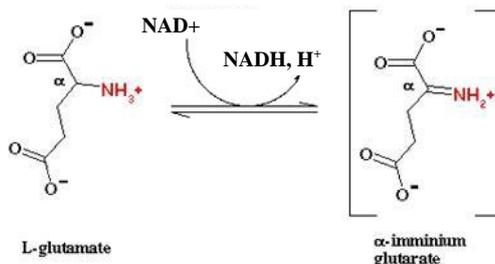
- Quel est l'effet de la substance A sur l'activité de l'enzyme?
- Donner le schéma réactionnel et établir l'équation de vitesse en présence de A.
- Calculer les paramètres que ces résultats vous permettent d'obtenir.

Exercice 15

Donner les expressions reliant les concentrations en substrat et en enzyme à la vitesse de la réaction dans le cas d'une inhibition compétitive et d'une inhibition non compétitive. Ecrire l'expression de $1/v = f(1/[S])$ et $1/v = f([I])$ dans

chaque cas.

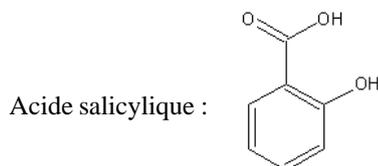
La glutamate déshydrogénase catalyse la réaction suivante:



Le cours de la réaction peut être suivi spectrophotométriquement par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm. Les données ci-dessous rendent compte de l'effet du salicylate de sodium (sal Na) sur la réaction d'oxydation du glutamate par cet enzyme:

Glutamate (mM)	vitesse ($A_{340\text{nm}}/\text{min}$)			
	Sans Sal Na	Avec Sal Na (20 mM)	Avec Sal Na (30 mM)	Avec Sal Na (40 mM)
1,5	0,21	0,12	0,10	0,08
2,0	0,25	0,14	0,12	0,10
3,0	0,28	0,17	0,14	0,12
4,0	0,33	0,19	0,16	0,13
8,0	0,44	0,23	0,19	0,16
16,0	0,44	0,26	0,21	0,18

- Démontrer graphiquement l'effet produit par le salicylate de sodium.
- Evaluer tous les paramètres de la réaction qui vous sont accessibles.



ϵ^M à 340 nm pour le NADH = $6.10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Exercice 7. Dans l'organisme, l'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase du foie (ADH). D'autres alcools sont aussi oxydés par l'ADH. Par exemple, le méthanol qui a un léger effet d'intoxication est oxydé par l'ADH en un produit très toxique, le formaldéhyde. L'effet toxique obtenu en ingérant le méthanol (une composante de plusieurs solvants commerciaux) peut être réduit en administrant l'éthanol. L'éthanol agit comme inhibiteur compétitif du méthanol en déplaçant le méthanol de l'ADH. Ceci donne suffisamment de temps au méthanol d'être excrété par les reins sans causer de dommages à l'organisme.

- Donnez le nom systématique de l'ADH, sa classification, ainsi que les trois premiers son numéro EC.
- Ecrivez les équations de conversion des alcools dont il est question ici, catalysées par l'ADH en leurs produits respectifs.
- Si un individu a ingéré 100 ml de méthanol (une dose létale), quel volume de whisky (50% éthanol par volume) doit on lui administrer afin de réduire l'activité de son ADH vis-à-vis du méthanol à 5% de sa valeur originale ?

En guise de rappel, l'organisme d'un adulte contient 40 l de fluide aqueux dans lequel l'alcool ingéré se mélange de façon uniforme. Les densités du méthanol et de l'éthanol sont de $0,79 \text{ g.cm}^3$. Les valeurs de K_M de l'ADH pour l'éthanol et le méthanol sont respectivement de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ et $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Le $K_I = K_M$ pour l'éthanol