

## 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  $\mu$ 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  $3 \mu$ 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  $1 \mu$ 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 ( $k_{\text{cat}}$ ) 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 $v_i$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	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. $\text{min}^{-1}$ )	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  $nM.s^{-1}$ ) pour différentes concentrations  $[S_0]$  du substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

$[S_0]$ ( $\mu M$ )	$v_i$ ( $nM.s^{-1}$ )	
	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:  $k_{cat}^{E_{inc}} = 15360 \text{ min}^{-1}$ .

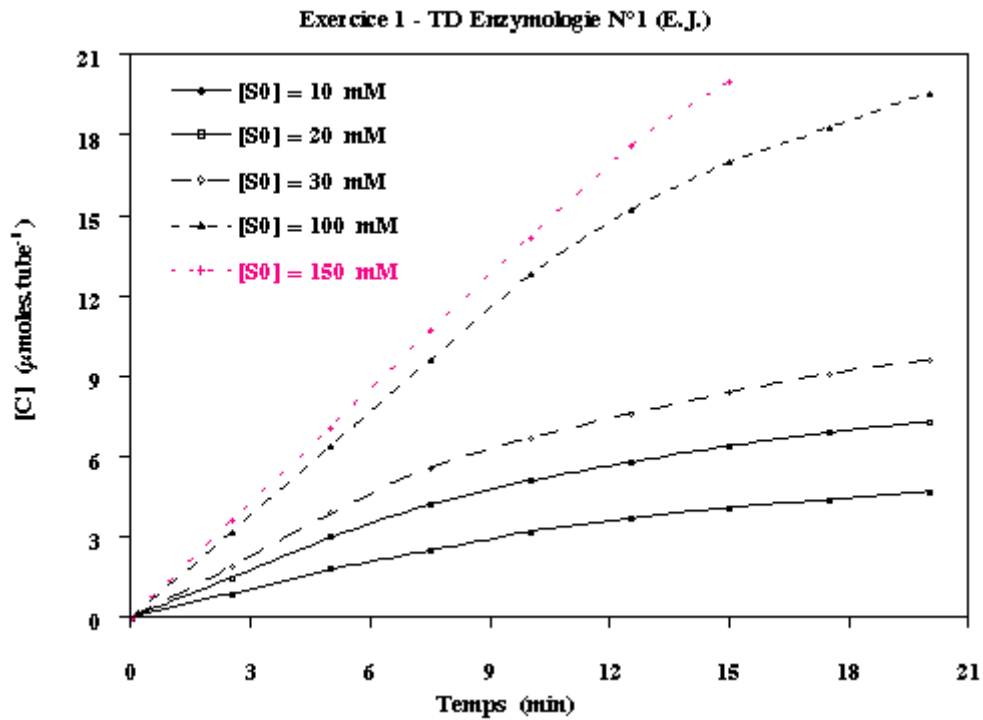
3. Un seul paramètre cinétique diffère entre les 2 expériences (d'un facteur 2). Lequel et pourquoi ?

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

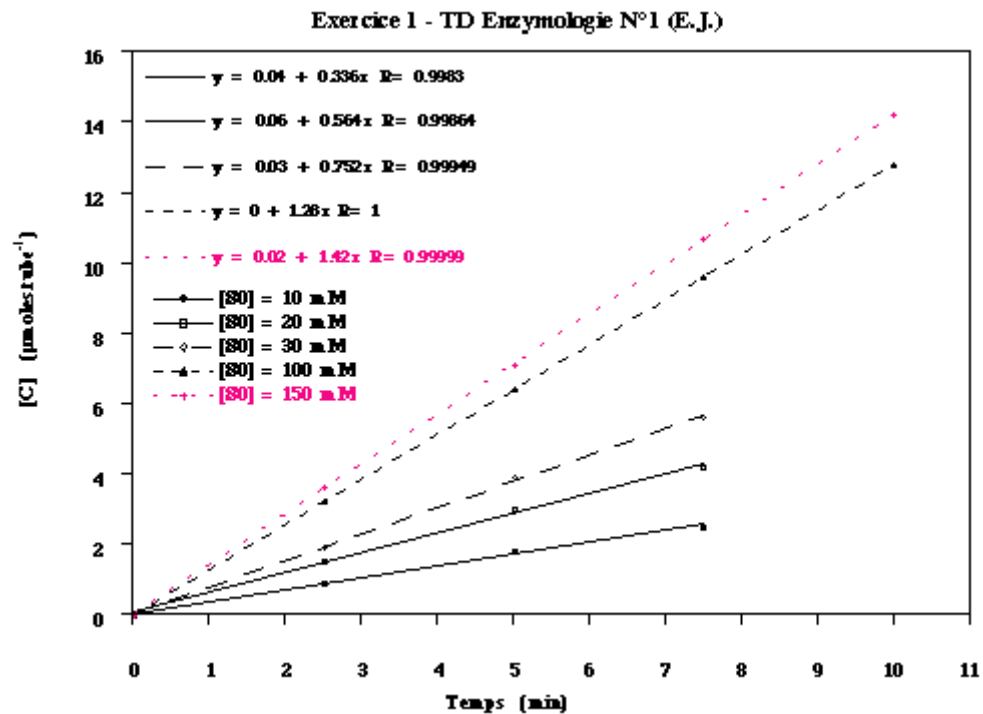
## Correction des Exercices 1, 2, 3 et 4.

### Question N°1

#### a. Tracé des cinétiques de la réaction enzymatique

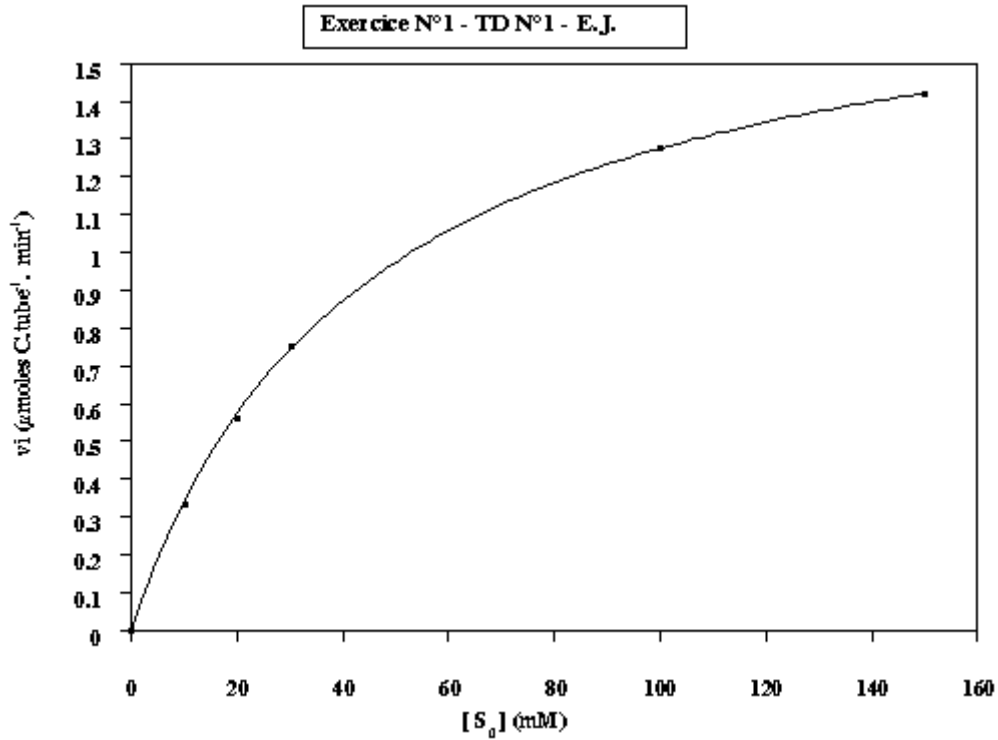


#### b. Détermination graphique des vitesses initiales à partir des cinétiques



$[S_0]$ (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

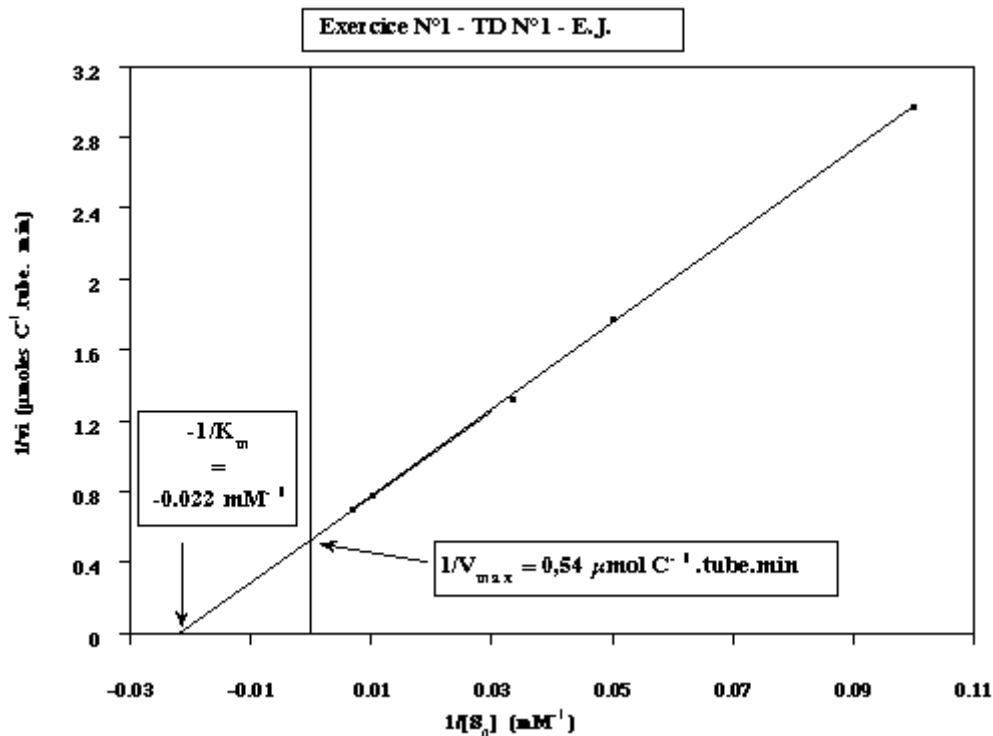
c. Courbe de saturation issue des cinétiques



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

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

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



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

e. Calcul de  $k_{\text{cat}}$

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

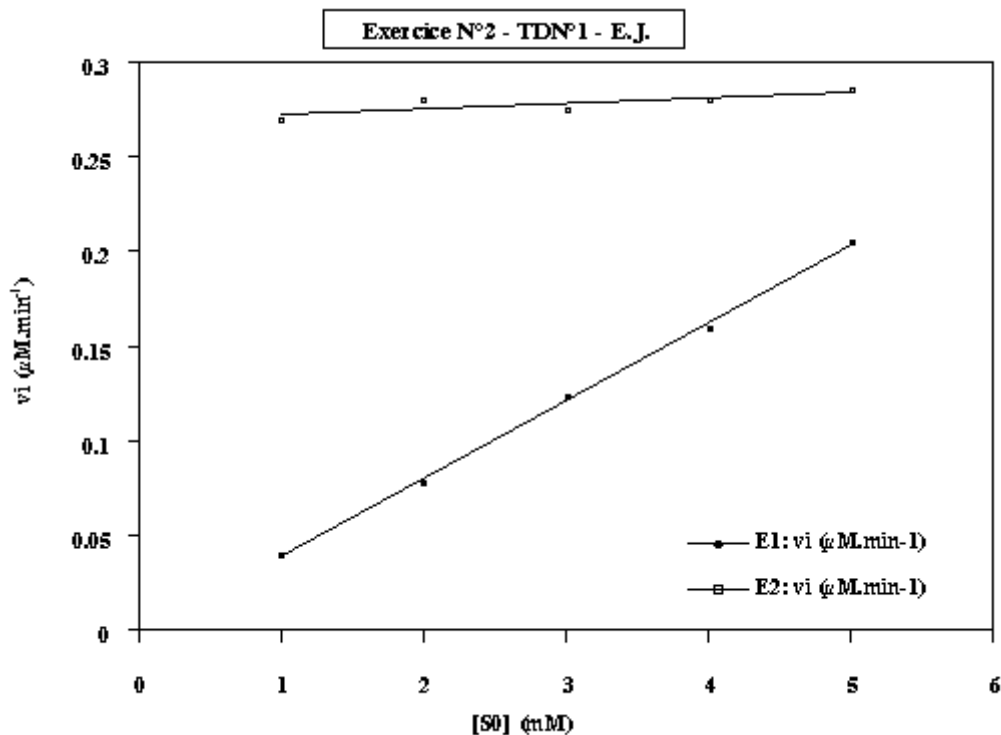
Donc :  $[E_0] = 3 \mu\text{M} \times (1 \text{ mL} / 3 \text{ mL}) = 1 \cdot 10^{-6} \text{ moles.L}^{-1}$

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

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

[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) :  $v_i = f([S]_0)$ .

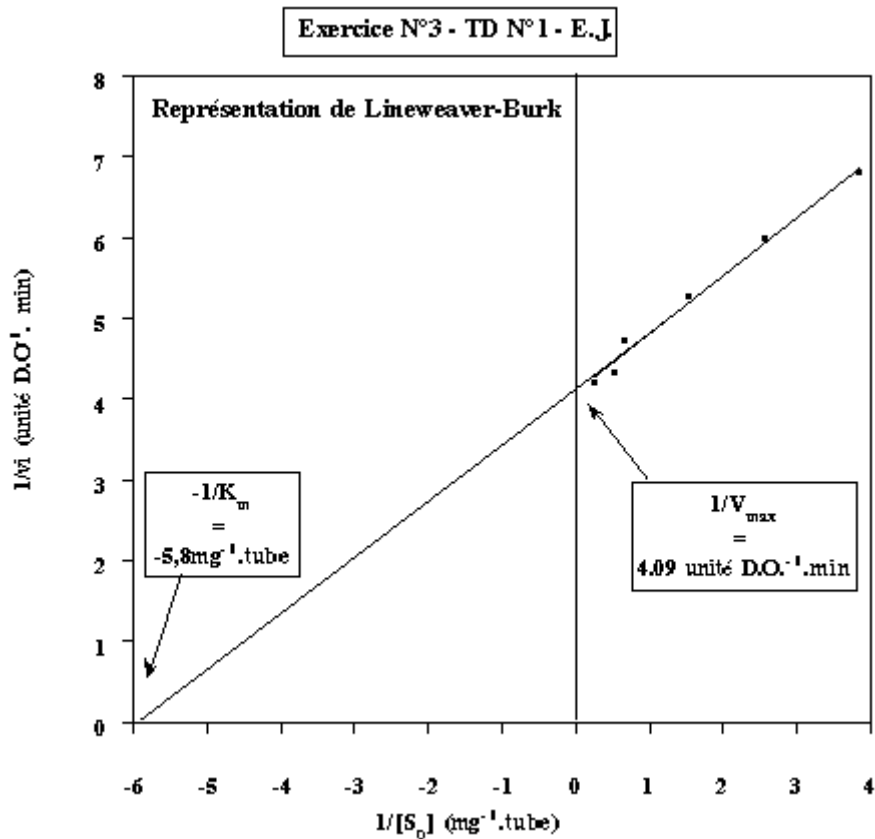
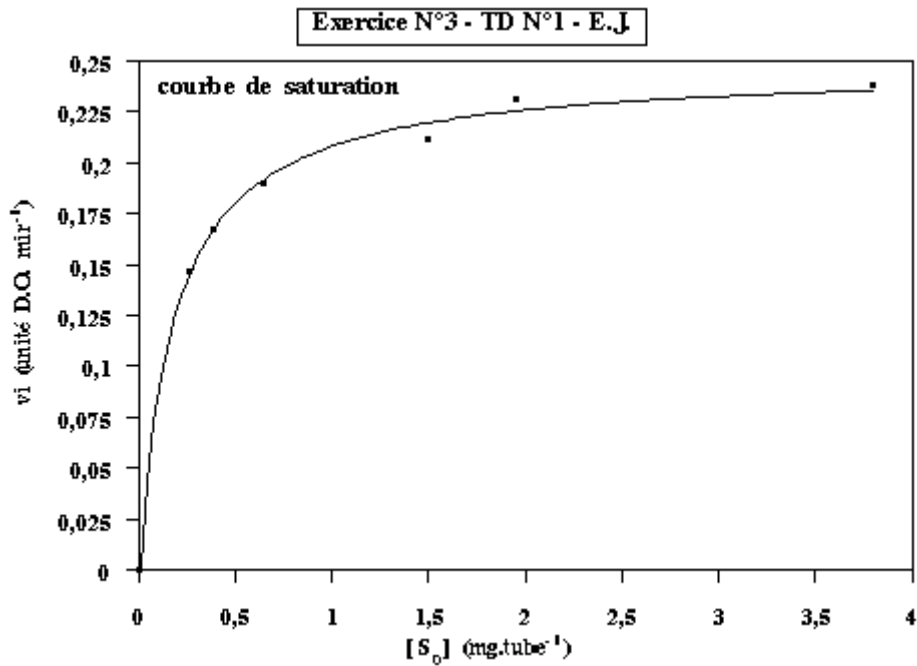
La gamme de concentrations de substrat étudiée (1 à 5 mM) n'est donc adaptée à **aucune** des 2 enzymes :

- 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 $V_{\text{Max}}$

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

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

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

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

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

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

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

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

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  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans un volume total de 10 mL.

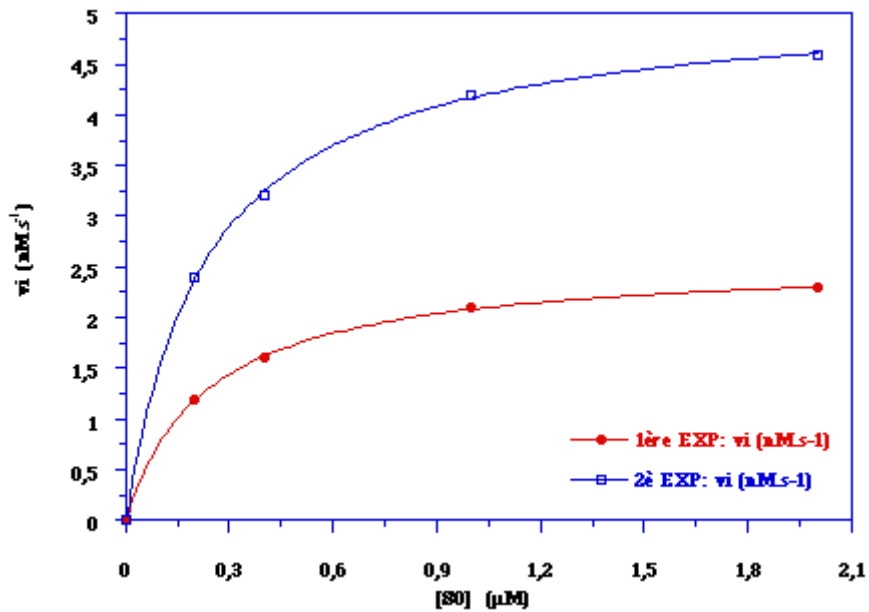
$$\text{Donc : } [E_0] = 0,2 \text{ (mL)} \times 10 \text{ (mg.mL}^{-1}) = 2 \text{ mg dans } 10 \text{ mL} = 2 \text{ mg.tube}^{-1}$$

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

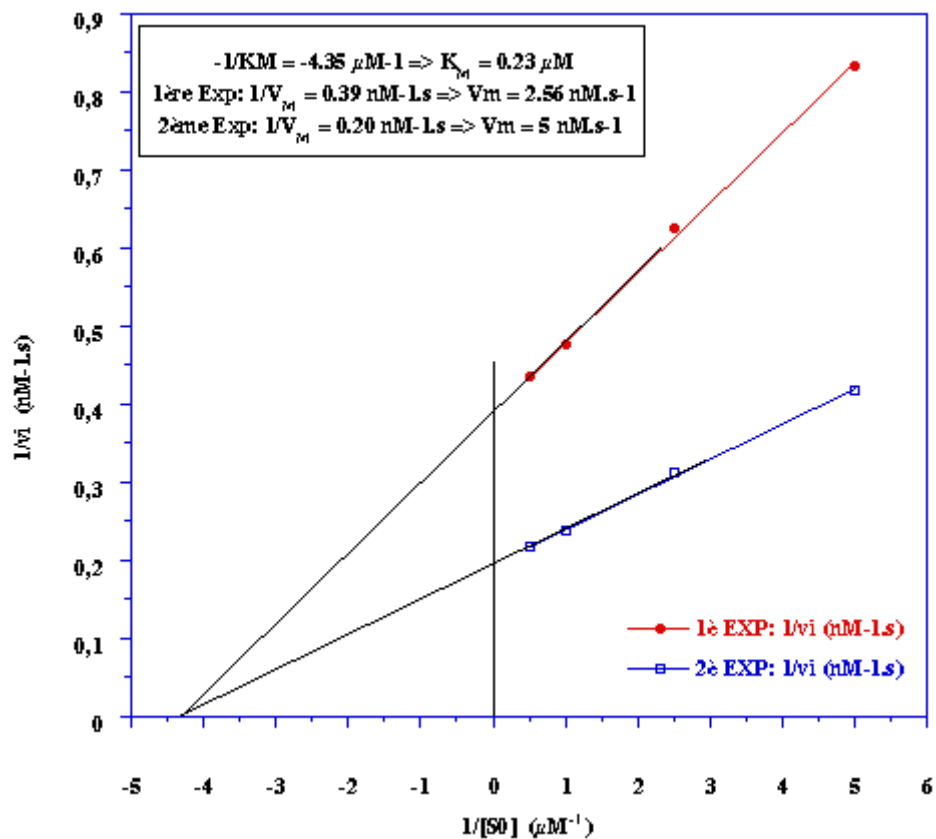
$$\text{L'activité spécifique est donc : } \text{A.S.} = V_{\text{Max}} / [E_0] = (0,137 \text{ unités.tube}^{-1}) / (2 \text{ mg.tube}^{-1}) = 68,5 \text{ mU.mg}^{-1}$$

## 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  $V_{\text{max}}$  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.