

## Série TD Enzymologie N°2

### Exercice 1

La lactase ( $\beta$ -galactosidase, E.C.3.2.1.23) hydrolyse le lactose en glucose et galactose. On détermine la vitesse d'hydrolyse du lactose par la lactase (dans les conditions initiales). Il apparaît  $0,672 \times 10^{-2}$  moles de glucose en 10 min. On a introduit dans le milieu 1 mL de Solution enzymatique dont la teneur en protéines est de  $2,85 \text{ g L}^{-1}$ .

- a) Ecrire l'équation de la réaction
- b) Que signifie le terme «conditions initiales», Préciser les conditions de concentrations en substrat.
- c) Calculer la concentration d'activité catalytique de la préparation enzymatique en  $\text{UI mL}^{-1}$
- d) Calculer l'activité spécifique de l'enzyme en  $\text{UI mg}^{-1}$  et en  $\text{Kat mg}^{-1}$
- e) Calculer l'activité molaire spécifique en considérant que l'on est en présence d'une enzyme pure ( $\text{PM} = 135000 \text{ Da}$ ).

### Exercice 2 (Etude cinétique d'une enzyme)

On réalise sur une préparation pure en enzyme la mesure de l'apparition du produit en fonction du temps pour une concentration en substrat de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  dont voici les résultats :

Temps en minutes	0	0,5	1	2	3	4	5
[Produit] en $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	109	205	405	489	534	555

1. Tracer le graphique de la concentration de produit en fonction du temps
2. Déterminer la vitesse initiale de la réaction enzymatique.

On mesure la vitesse initiale pour différente concentration de substrat.

[S] en $\text{mol.L}^{-1}$	0,0125	0,025	0,05	0,1
$V_i$ en $\mu\text{mol.min}^{-1}$	133	167	190	compléter

3. Donner la signification de  $V_{\text{max}}$  et  $K_m$ .
4. Déterminer graphiquement les constantes cinétiques de cette enzyme.

### Exercice 3

Une enzyme catalyse la réaction :  $S \rightarrow P$ . Les vitesses initiales ont été déterminées pour chacune des concentrations initiales en substrat suivantes :

[S] en mol/L	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$6,25 \cdot 10^{-5}$
$V_i$ (nmol/L/min)	75	74,9	60	56,25	15

1. Vérifier que la cinétique est michaelienne.
2. Si  $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  ? quelle est la vitesse initiale ? Même question pour  $[S] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  et  $[S] = 0,02 \text{ M}$ .
3. Si  $[S] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ , quelle est la vitesse initiale si la quantité d'enzyme est doublée ?
4. Si  $[S] = 0,04 \text{ M}$ , quelle est la concentration en P après 3 min ?

### Exercice 4

La glucokinase catalyse la réaction  $D\text{-glucose} + \text{ATP} \rightarrow D\text{-glucose6-phosphate} + \text{ADP}$  On donne la constant de Michaelis de la glucokinase de *Bacillus stearothermophilus* pour les Substrats suivants.

	Km(M)
ATP	$6 \cdot 10^{-5}$
ITP	$6 \cdot 10^{-4}$
GTP	$4,5 \cdot 10^{-3}$
UTP	$3,6 \cdot 10^{-3}$
CTP	$1,2 \cdot 10^{-3}$

Classer les substrats par ordre d'affinité apparente croissante pour la glucokinase.

### Exercice 5

Le glucose est dégradé dans l'organisme par la voie de la glycolyse. La première réaction de cette voie est une phosphorylation du glucose qui peut être catalysée par deux enzymes différentes: la glucokinase ou l'hexokinase. On se propose d'étudier les caractères cinétiques de ces deux enzymes vis-à-vis de leur substrat commun: le glucose.

La vitesse initiale de la réaction a été mesurée pour des concentrations différentes en substrat A 20°C et à pH=7. Les résultats expérimentaux sont reproduits dans le tableau ci-dessous.

La concentration en enzyme utilisée pour les deux séries d'expériences est la même.

[glucose] en mole/L	Vi avec la glucokinase en $\mu\text{molL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	[glucose] en mole/L	Vi avec l'hexokinase en $\mu\text{molL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
$5,0 \cdot 10^{-5}$	1,61	$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,499
$6,7 \cdot 10^{-5}$	2	$6,7 \cdot 10^{-5}$	0,575
$10,0 \cdot 10^{-5}$	2,67	$10,0 \cdot 10^{-5}$	0,607
$20,0 \cdot 10^{-5}$	2,93	$20,0 \cdot 10^{-5}$	0,806
$50,0 \cdot 10^{-5}$	4,17	$50,0 \cdot 10^{-5}$	0,893

Déterminer les valeurs de KM et de Vm pour ces deux enzymes.

Comparer les deux KM. Conclure.

Comparer les deux Vm. Conclure.

Sachant que la glycémie normale est d'environ 5 mmol.L-1, indiqué si chacune de ces deux enzymes agit dans les conditions d'obtention de la vitesse maximum.

Quelle serait l'influence d'une augmentation importante de la glycémie?

### Exercice 6

Les résultats suivants sont obtenus au cours d'une réaction enzymatique, (1) en l'absence d'inhibiteur, (2) et (3) en présence de deux inhibiteurs différents à la concentration de 5 mM.

[E totale] est la même dans chaque expérience. La vitesse est déterminée en micromoles de produit apparu par minute.

[S] (en mM)	(1)	(2)	(3)
1	12	4.3	5.5
2	20	8	9
4	29	14	13
8	35	21	16
12	40	26	18

a. Déterminer Vmax et Km de l'enzyme.

b. Déterminer le type d'inhibition et le Ki pour chaque inhibiteur.

### Exercice 7

On suit la réaction enzymatique, en absence et en présence de l'inhibiteur I, en mesurant l'absorbance du produit. Pour différentes concentrations initiales en substrat, on obtient les vitesses initiales suivantes en (U.A). (U.A: Unité Absorbance).

[S] <sub>0</sub> (en mM)	V <sub>i</sub> (U.A.min <sup>-1</sup> ) sans inhibiteur	V <sub>i</sub> (U.A.min <sup>-1</sup> ) [I] = 9mM
0.032	0.18	0.070
0.048	0.25	0.097
0.076	0.35	0.137
0.096	0.42	0.164
0.136	0.50	0.195
0.232	0.68	0.270
0.348	0.78	0.312

1. Déterminer les paramètres cinétiques (V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> et K<sub>cat</sub>) et les paramètres cinétiques en présence de l'inhibiteur. Exprimer K<sub>cat</sub> en sec<sup>-1</sup>.
2. Préciser le type d'inhibition et calculer la constante d'inhibition K<sub>i</sub>. Pour V<sub>max</sub> la concentration doit être exprimée en molarité. Données : l=1cm; ε<sub>M</sub> Produit=2600M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>; [E]<sub>0</sub>=27nM