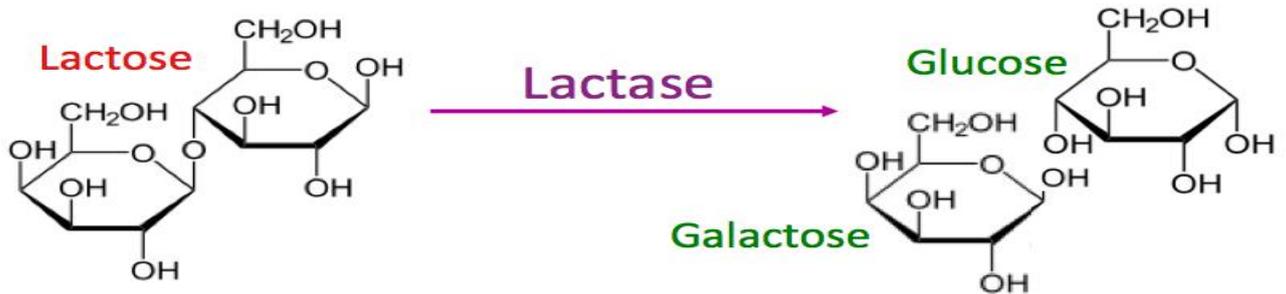


Correction TD Série 2 (Enzymologie, Partie 1)

Correction. Exercice 1: Calcul des Activités enzymatiques

a) Ecrivons la réaction catalysée par la lactase ou la beta Galactosidase



b) Les conditions initiales

On se place dans les conditions pour déterminer la vitesse initiale en particulier la concentration en Substrat doit être supérieure à celle d'enzyme pour que $V=V_i$ le plus longtemps possible.

c) Calculons la concentration d'activité catalytique de la préparation enzymatique:

En UI/ml. Elle est égale à $0,672 \times 10^{-2} \times 10^6 / 10 = 672 \text{ UI/ml}$

En Kat/ml. Elle est égale à $0,672 \times 10^{-2} / 10 \times 60 = 1,12 \times 10^{-5} \text{ Kat/ml}$

d) Calcul de l'activité spécifique:

En UI/mg. Elle est égale à $672 \text{ UI} / 2,85 \times 10^{-3} = 236 \text{ UI/mg}$

En Kat/mg; Elle est égale à $1,12 \times 10^{-5} \text{ Kat} / 2,85 \times 10^{-3} = 3,92 \times 10^{-2} \text{ Kat/mg}$

e) Calcul de l'activité molaire spécifique sachant que l'enzyme est pure et son $PM = 135000 \text{ Da}$

On a combien de mole d'enzyme dans les 2,85 mg de protéines

2,85 mg d'enzyme correspond donc à $2,85 \times 10^{-3} / 135000 \text{ mole} = 2,1 \times 10^{-5} \text{ moles}$

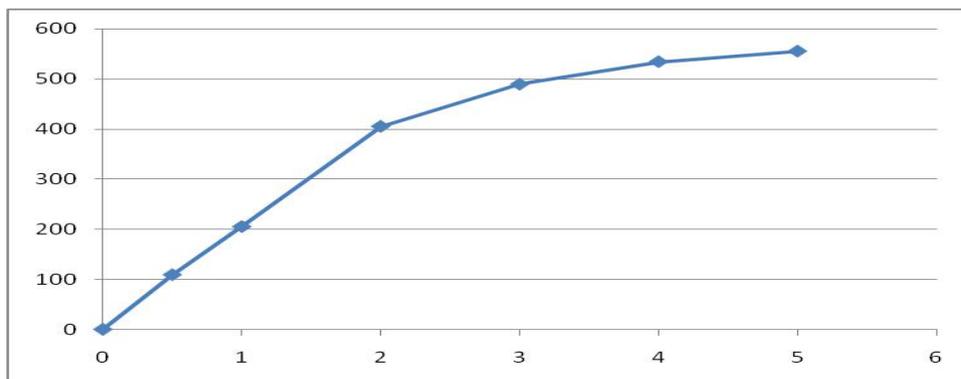
L'activité spécifique molaire est égale:

En UI/mole = $672 \text{ UI} / 2,1 \times 10^{-5} = 320 \times 10^5$

En Kat/mole = $1,12 \times 10^{-5} / 2,1 \times 10^{-5} = 0,533 \text{ Kat/mole}$

Correction Exercice 2

1. Graphique: $[P] = f(\text{temps})$



2. Sur le graphique, on voit que la réaction fonctionne en vitesse initiale jusqu'à un temps égal à 2 minutes. Cette partie de la courbe est une droite. La pente de cette droite représente la vitesse initiale, elle est égale à $201,3 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$

3. Signification de V_{max} et K_m (Voir cours)

4. Calcul de V_{max} et K_m

Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk

$1/S \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	80	40	20
$1/V_i \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	$7,52\cdot 10^{-3}$	$5,99\cdot 10^{-3}$	$5,26\cdot 10^{-3}$

Sur du papier millimétré, vous tracer $1/V_i$ en fonction de $1/S$

L'équation de Lineweaver-Burck : $1/V = (k_m/V_{\text{max}}) \times (1/[S]) + 1/V_{\text{max}}$, coupe l'axe des abscisses en $(-1/K_m)$ et l'axe des ordonnées en $(1/V_{\text{max}})$

On doit compléter et relier les points par une droite. L'équation de la droite est $1/V_i = 4\cdot 10^{-5} \times 1/S + 0,0045$

Calcul de V_{max}

Sur la courbe, Lorsque $1/S = 0$ $1/V_i = 1/V_{\text{max}}$ Donc $1/V_{\text{max}} = 0,0045 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}$

Donc $V_{\text{max}} = 222 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{min}$

Calcul de K_m

Lorsque $1/V_i = 0$ alors $1/S = -1/K_m$ donc $-1/K_m = -122,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Donc $K_m = 8,9\cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$

Calcul de V_i quand $[S] = 0,1 \text{ mol/L}$

Si $[S] = 0,1 \text{ mol/L}$ donc $1/[S] = 10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

D'après l'équation de la droite **$1/V_i = 4\cdot 10^{-5} \times 1/S + 0,0045$**

$1/V_i = 1,9\cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ donc $V_i = 204 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}$

Correction Exercice 3

Question 1. Vérifier que la cinétique est michaelienne. Si la cinétique est michaelienne, les données doivent vérifier la relation de Michaelis-Menten. Un moyen de le constater est de tracer $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$. Si la cinétique est michaelienne, on doit obtenir une droite.

On a tracé la corbe. La cinétique est michaelienne, avec $V_{\text{max}} = 75 \text{ nmol/L}/\text{min}$ et $K_m = 2,5\cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Question 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 $[S] = 0,02 \text{ M}$.

La cinétique est michaelienne, avec $V_{\text{max}} = 75 \text{ nmol/L}/\text{min}$ et $K_m = 2,5\cdot 10^{-5} \text{ M}$. Pour répondre à la question, il faut comparer $[S]$ et K_m et/ou remplacer $[S]$ dans la relation de Michaelis-Menten.

Si $[S] = K_m$ alors $V_i = (V_{\text{max}}) / 2 = 37,5 \text{ nmol/L}/\text{min}$.

Si $[S] = 2 K_m$ alors $V_i = (2 / 3) \cdot V_{\text{max}} = 50 \text{ nmol/L}/\text{min}$.

Si $[S] = 0,02 \text{ M}$ alors $[S]$ est très supérieure à K_m donc $V_i = V_{\max}$.

Question 3: Si $[S] = 1.10^{-2} \text{ M}$, quelle est la vitesse initiale si la quantité d'enzyme est doublée?
Il faut se souvenir, que dans la relation de Michaelis-Menten, $V_{\max} = k_3 [E]$.

De plus si $[S] = 1.10^{-2} \text{ M}$, la concentration initiale est alors très supérieure à K_m
alors $V_i = V_{\max} = 75 \text{ nmol/L/min}$.

Si l'enzyme totale double ($[E'] = 2 [E]$) alors la vitesse maximale double, donc la vitesse initiale double et est égale à 2×75 soit 150 nmol/L/min .

Question 4: Si $[S] = 0,04 \text{ M}$, quelle est la concentration en P après 3 min?

Si $[S] = 0,04 \text{ M}$ alors $V_i = V_{\max} = 75 \text{ nmol/L/min}$ ($[S]$ très supérieure à K_m). La vitesse est donc de 75 nmol/L de produit formé en une minute.

Donc en 3 minutes $[P \text{ 3 min}] = 3 \times 75 \text{ nM} = 225 \text{ nM}$

Correction Exercice 4

Calcul de V_{\max} et K_m

Représentation en coordonnées inverses

$1/[Glc] \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$	$1/V_i \text{ avec Glucokinase}$ $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}$	$1/[Glc] \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$	$1/V_i \text{ avec Hexokinase}$ $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}$
200	0.626	200	2.041
150	0.500	150	1.739
100	0.375	100	1.647
50	0.341	50	1.241
20	0.240	20	1.120

Construire la courbe $1/V_i$ et fonction de $1/[Glc]$ pour les deux enzymes
Vous obtenez une droite pour chaque représentation.

A partir des deux représentations, on détermine K_m et V_{\max} pour les deux enzymes;

Pour la Glucokinase

Calcul de $1/V_{\max}$: Lorsque $1/[S] = 0$ $1/V_i = 1/V_{\max}$ Donc $1/V_{\max} = 0.2078 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}$ Donc
 $V_{\max} = 4.81 \mu\text{mol/L/min}$.

Calcul de $1/K_m$: Lorsque $1/V_i = 0$ $1/[S] = -1/K_m = -103.4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ Donc $K_m = 9.62 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$

Pour l'Hexokinase, d'après la représentation de Lineweaver et Burk

Calcul de $1/V_{\max}$: Lorsque $1/[S] = 0$ $1/V_i = 1/V_{\max}$ Donc $1/V_{\max} = 1.0295 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}$ Donc
 $V_{\max} = 0.97 \mu\text{mol/L/min}$.

Calcul de $1/k_m$: Lorsque $1/V_i = 0$ $1/[S] = -1/K_m = -201.8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ Donc $K_m = 4.95 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$;

L'hexokinase a plus d'affinité pour le glucose que la Glucokinase car son K_m est plus petit par
contre sa vitesse maximale est basse.

La glycémie est de l'ordre de 5 mmole/L , soit environ égale au K_m de l'hexokinase donc la
vitesse de la réaction sera environ $V_{\max}/2$ et très inférieure au K_m de la Glucokinase. Dans une

réaction enzymatique pour que V_{max} soit atteint, il faut que $[S] \gg K_m$, ce n'est pas le cas ici. Donc, les enzymes fonctionnent au ralenti dans les conditions physiologiques.

Si la glycémie augmente de manière importante, la vitesse des enzymes va augmenter pour se rapprocher de V_{max} . De plus, le K_m de la glucokinase vis à vis du glucose est élevé donc elle n'agit de façon significative que lorsque le taux du glucose intracellulaire est augmenté.

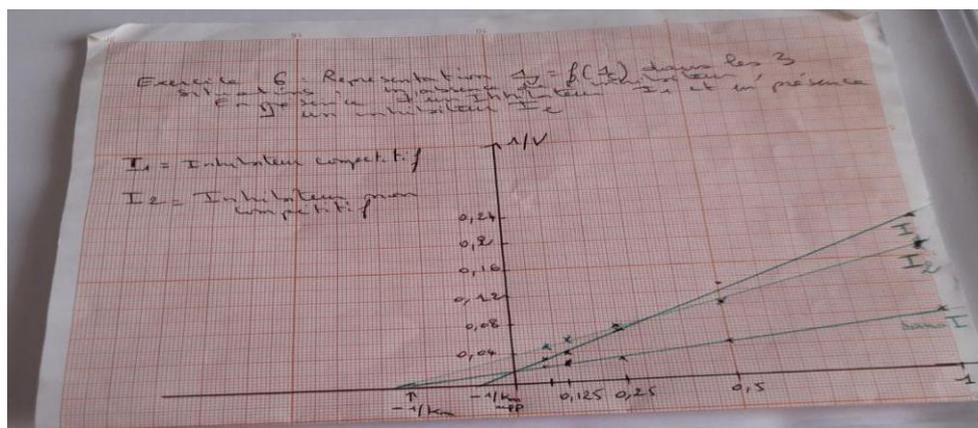
Exercice 6

Pour répondre aux questions, il faut tracer $1/V$ en fonction de $1/S$

Convertir les valeurs et Trçons le tableau des coordonnées inverses.

1/S en mM ⁻¹	1/V sans Inhibiteur	1/V en présence de I ₁	1/V en présence de I ₂
1	0.08	0.23	0.18
0.5	0.05	0.125	0.111
0.25	0.03	0.07	0.076
0.125	0.028	0.04	0.0625
0.08	0.025	0.03	0.055

Trçons les représentations $1/V$ en fonction de $1/S$ dans les trois situations



D'après le graphe

En absence de l'inhibiteur

$$-1/K_m = -0.25 \text{ donc } K_m = 4 \text{ mM}$$

$$1/V_{max} = 0.02 \text{ donc } V_{max} = 50 \mu\text{mol/min}$$

En présence de l'inhibiteur I₁

On remarque que $V_{max} = V_{max \text{ app}}$ par contre K_m est différent de $K_m \text{ app}$. Il s'agit donc d'une inhibition compétitive.

Déterminant $K_{m \text{ app}}$

Sur le graphe:

$$-1/k_m \text{ app} = -0.07 \text{ mM}^{-1} \text{ donc } K_m \text{ app} = 14,2 \text{ mM}$$

Calculant K_i

$$K_i = K_m \times [I] / (K_m \text{ app} - K_m)$$

Remplaçant les constantes par leurs valeurs:

$$K_i = 4 \times 5 / 14.2 - 4 \quad \text{Donc } K_i = 1.96 \text{ mM} \text{ donc } K_i \text{ est proche de } 2 \text{ mM} \text{ pour l'inhibiteur cométitif}$$

En présence de l'inhibiteur I₂

On remarque que K_m et K_m app sont les mêmes par contre V_{max} est différent de V_{max} apparent Il s'agit donc d'un inhibiteur non compétitif

Calculant V_{max} app

$$1/V_{\text{max app}} = 0.04 \text{ donc } V_{\text{max}} = 25 \text{ umol/min}$$

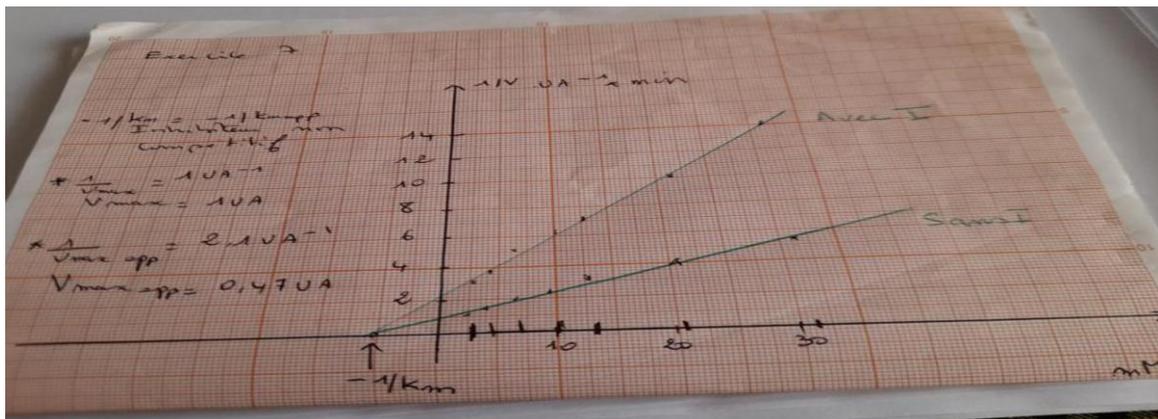
Calculant K_i par cet inhibiteur

$$K_i = V_{\text{max app}} [I] / (V_{\text{max}} - V_{\text{max app}})$$

$$K_i = 25 \times 5 / 50 - 25 \quad \text{donc } K_i = 5 \text{ mM}$$

Correction exercice 7

Comme pour l'exercice 6. on converti les données en traçant un tableau et on trace après les représentations en absence de l'inhibiteur et en présence de l'inhibiteur. Le graphe obtenu est le suivant:



D'après le graphe il s'agit d'une inhibition non compétitive (K_m n'a pas changé par contre V_{max}=x est différent de V_{max} apparent.

En absence d'inhibiteur

$$-1/K_m = -5 \text{ mM}^{-1} \text{ Donc } K_m = 0,2 \text{ mM}$$

$$1/V_{\text{max}} = 1 \text{ UA}^{-1} \text{ min} \text{ DONC } V_{\text{max}} = 1 \text{ UA /min}$$

Expression de de V_{max}

On passe de UA.min⁻¹ à μM.min⁻¹ avec la relation de Beer-Lambert :

$$V_{\text{max}} (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{V_{\text{max}} (\text{UA} \cdot \text{min}^{-1})}{\epsilon M \cdot l}$$

$$V_{\text{max}} = 1 / (2600 \times \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}) = 38.4 \cdot 10^{-6} \text{ M/min} = 38,4 \text{ uM/min.}$$

Calcul de Kcat

$$k_{cat} = V_{max} / [E_0] = (38.4 \cdot 10^{-6} \text{ M/min} / 27 \cdot 10^{-9} \text{ M}) = 1422 \text{ min}^{-1} = 23,7 \text{ s}^{-1}$$

Il faut diviser par 60 pour passer des min⁻¹ en s⁻¹ puisque l'acte catalytique a lieu 60 fois moins souvent en 1 seconde que en 1 minute.

Calcul de Vmax App

$$1/v_{max \text{ app}} = 2 \text{ UA/min} \text{ donc } V_{max \text{ app}} = 0.5 \text{ UA/Min}$$

$$\text{En Molarité } V_{max \text{ app}} = 19,2 \mu\text{M/min}$$

Calcul de Ki

Il s'agit d'une inhibition non compétitive

$$K_i = V_{max \text{ app}} \times [I] / (V_{max} - V_{max \text{ App}})$$

$$K_i = 9 \text{ mM}$$