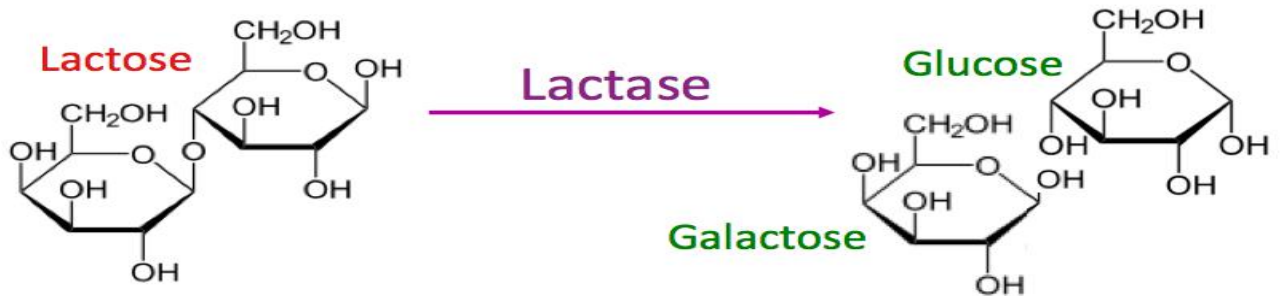


## Correction TD Série 2 (Enzymologie, Partie 1)

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  $2,85 \times 10^{-3} / 135000 \text{ mole} = 2,1 \times 10^{-5} \text{ moles}$

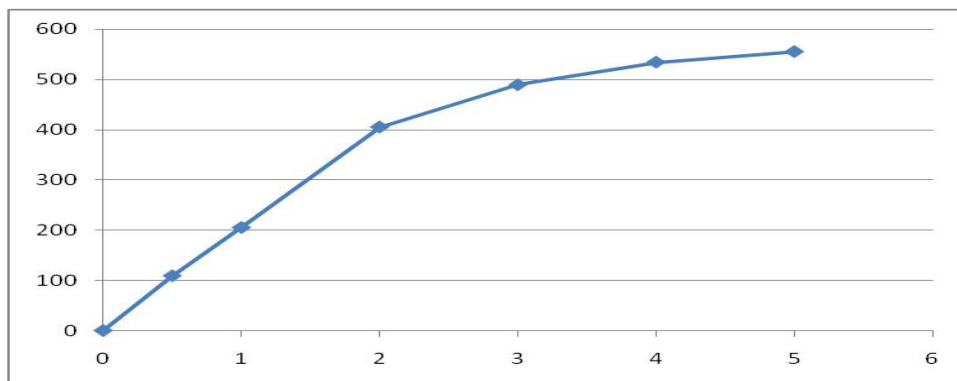
L'activité spécifique molaire est égale:

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  $V_{\text{max}}$  et  $K_m$  (Voir cours)

4. Calcul de  $V_{\text{max}}$  et  $K_m$

Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk

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

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  $1/V_i = 4.10^{-5} \times 1/S + 0,0045$**

Calcul de  $V_{\text{max}}$

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  **$1/V_i = 4.10^{-5} \times 1/S + 0,0045$**

**$1/V_i = 1.9\cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$  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  $2 \times 75$  soit  $150 \text{ nmol/L/min}$ .

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  $75 \text{ nmol/L}$  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  $5 \text{ mmole/L}$ , 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.

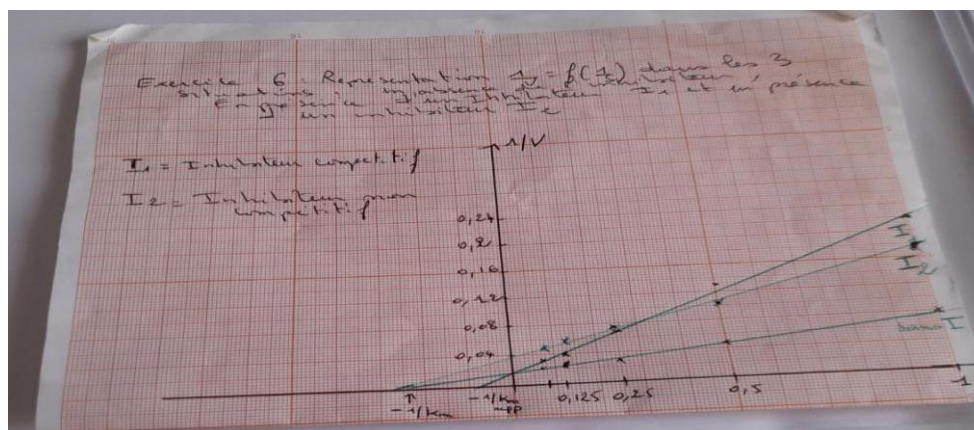
### Exercice 6

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 <sup>-1</sup>	1/V sans Inhibiteur	1/V en présence de I <sub>1</sub>	1/V en présence de I <sub>2</sub>
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

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

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

#### En présence de l'inhibiteur I<sub>1</sub>

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 $K_{mapp}$

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 I<sub>2</sub>

On remarque que K<sub>m</sub> et K<sub>m</sub> app sont les mêmes par contre V<sub>max</sub> est différent de V<sub>max</sub> apparent Il s'agit donc d'un inhibiteur non compétitif

### Calculant V<sub>max</sub> app

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

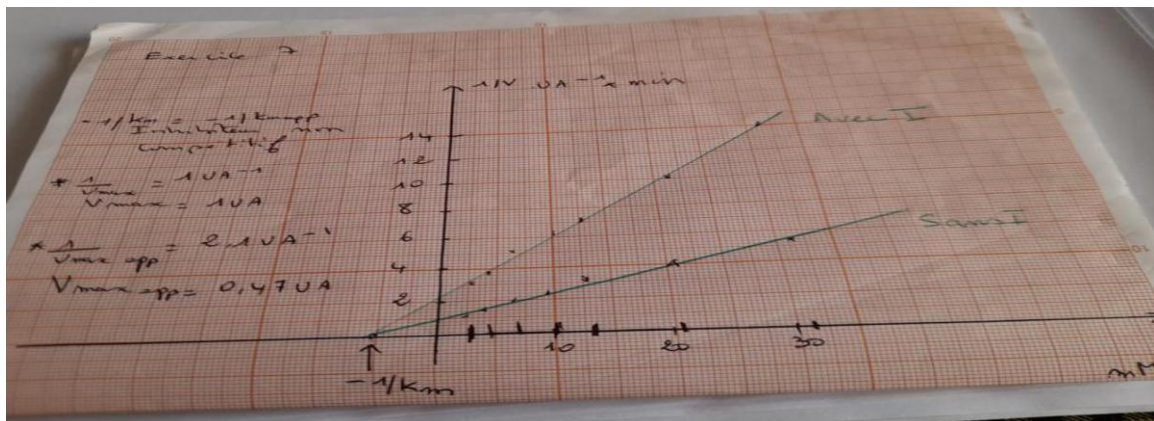
### Calculant K<sub>i</sub> par cet inhibiteur

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

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

### 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<sub>m</sub> n'a pas changé par contre V<sub>max</sub>=x est différent de V<sub>max</sub> 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<sub>max</sub>

On passe de UA.min<sup>-1</sup> à μM.min<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> en s<sup>-1</sup> 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

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

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