



TRAVAUX DIRIGES

CINETIQUES ENZYMATIQUES

GBA 1

P Chaliier, L Preziosi-Belloy

Enzymes à comportement michaelien

Exercice de révision pour faire le point (un bilan) des compétences acquises pour la partie Enzymes. Ceci vous permettra d'évaluer ce que vous savez par rapport à ce que vous devez savoir

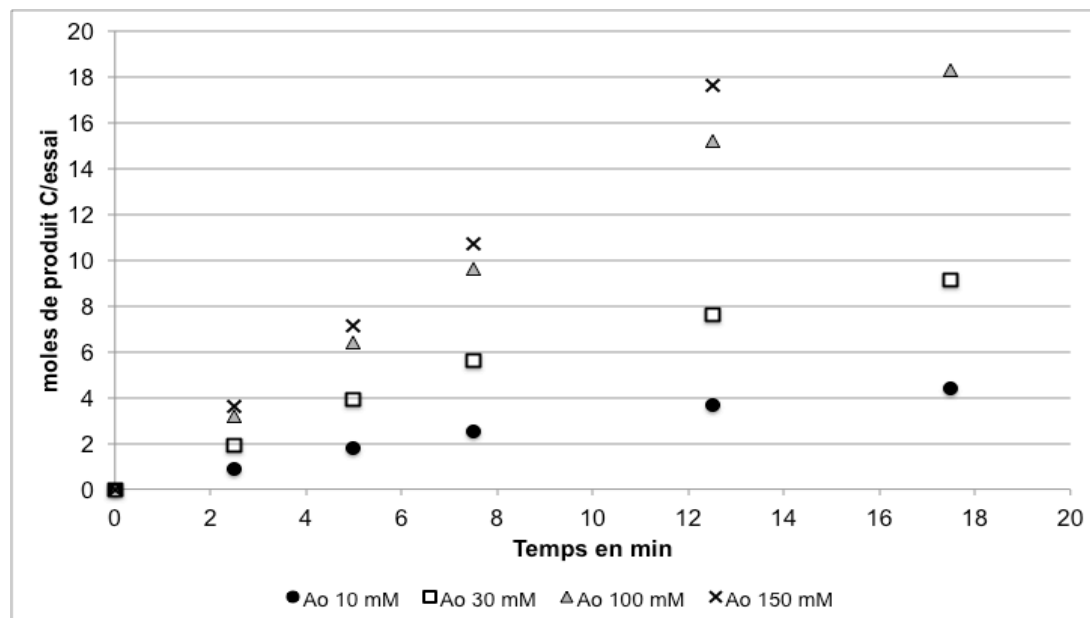
1. Cinétique selon le modèle de Michaelis–Menten

- A l'aide d'un schéma expliquez ce qu'on appelle la phase stationnaire dans une cinétique enzymatique.
- Quelle est l'étape limitante de la réaction dans le modèle de Michaelis-Menten ?
- Comment peut-on exprimer la vitesse initiale d'une réaction enzymatique par rapport à cette étape ?
- Que devient cette expression quand la concentration en substrat est saturante ou en excès ?
- Pour cette condition spécifique, comment évolue la vitesse de la réaction au cours du temps ?
- Donner la définition, l'expression et l'unité de la constante catalytique.
- A quoi correspond une Unité enzymatique.

2. Détermination des paramètres cinétiques

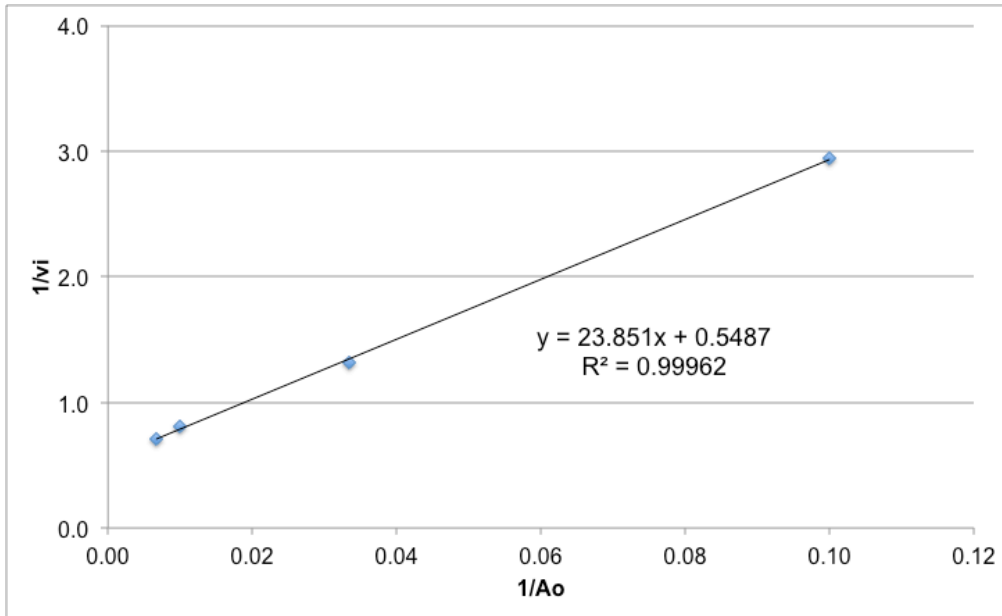
Une enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse : $A + H_2O \rightarrow C + D$

Les résultats de la cinétique (formation du produit C en fonction du temps) obtenus pour différentes concentrations en substrat A et pour une même concentration en enzyme sont reportés dans la figure 1.



- Déterminez les vitesses initiales. Dans quelle condition de concentration est le substrat A ? Pourquoi l'eau n'est-elle pas prise en compte ?

- A partir de la figure 2, déterminez les paramètres cinétiques de l'enzyme. Ces résultats sont-ils cohérents ?
- Calculez la constante catalytique sachant que l'enzyme a été utilisée à une concentration de 1 mM.
- Quelles données manque t'il pour exprimer l'activité spécifique de l'enzyme ?



Cinétique enzymatique à 2 substrats

I- Réaction enzymatique impliquant 2 substrats, A et B.

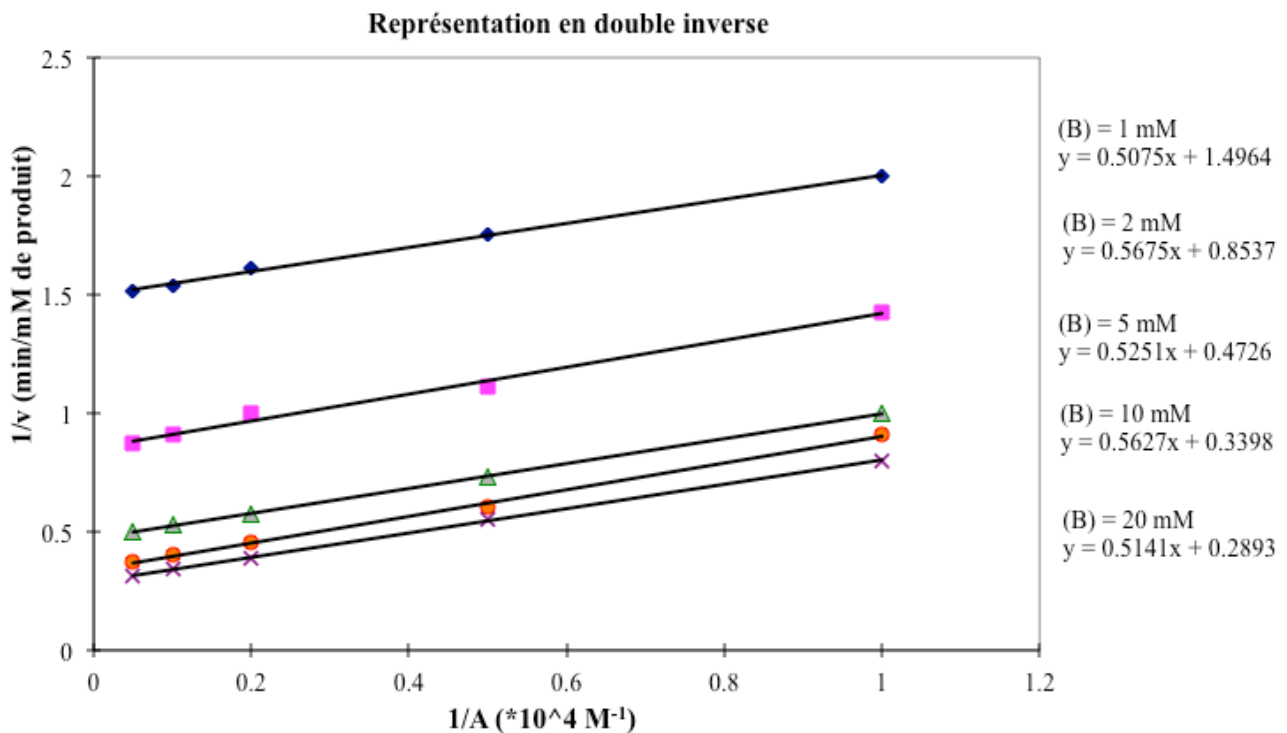
Pour déterminer le mécanisme de la réaction, différentes mesures de vitesse initiale en présence de concentrations variables de substrats sont effectuées.

Concentration A (10^{-4} M)	Concentration B (10^{-3} M)				
	1	2	5	10	20
1	0,50	0,70	1,00	1,10	1,25
2	0,57	0,90	1,37	1,65	1,80
5	0,62	1,00	1,73	2,20	2,60
10	0,65	1,10	1,90	2,50	2,90
20	0,66	1,15	2,00	2,70	3,20

Les vitesses sont exprimées en mM de produit apparu par minute.

A partir de la figure ci-dessous :

- Déterminer le mécanisme de la réaction.
- Déterminer les constantes V_{max} et K_m pour chacun des deux substrats et la constante catalytique (exprimée en s^{-1}) sachant que la concentration d'enzyme est égale à 10^{-5} M.

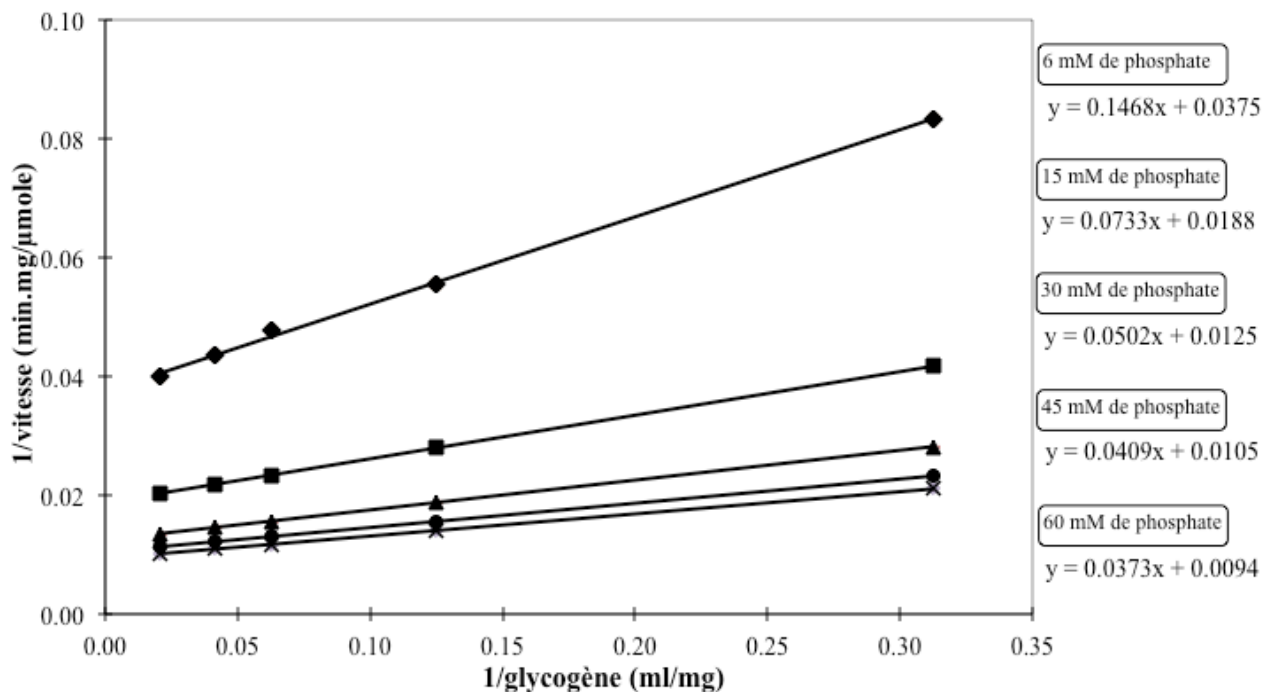


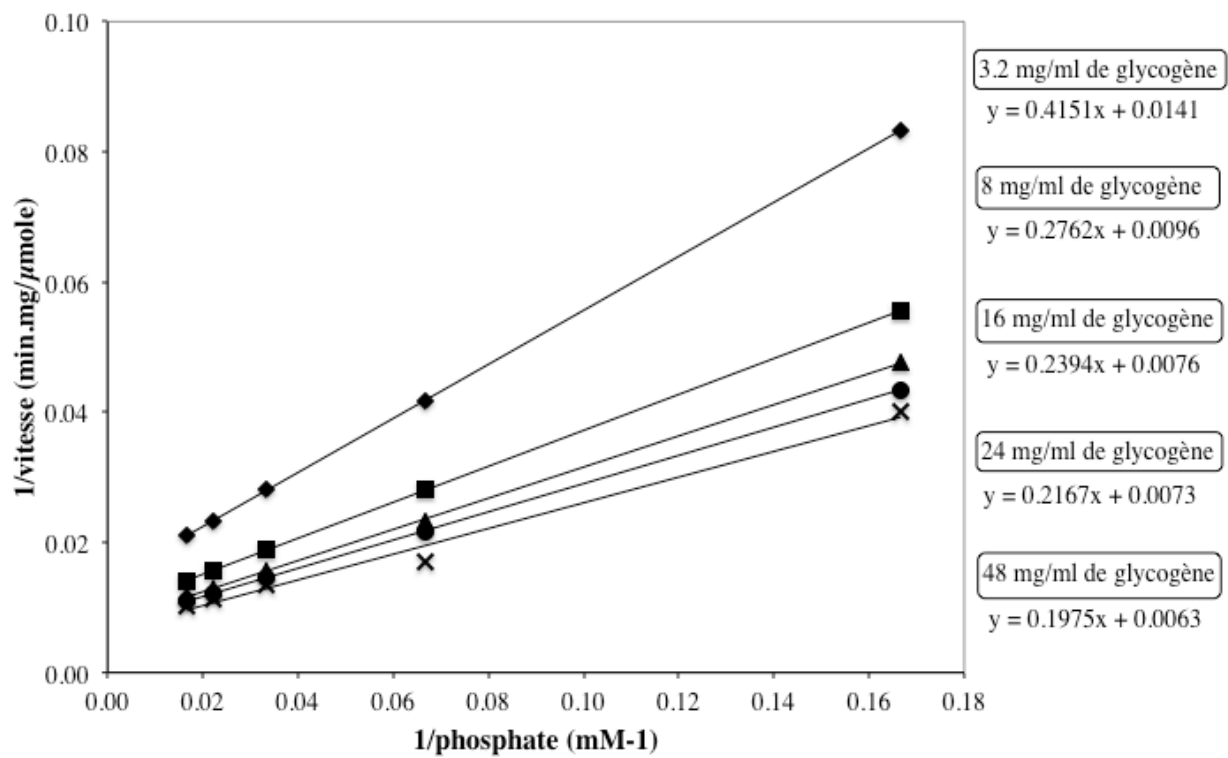
II- Réaction catalysée par la glucogène phosphorylase (α 1-4 glucane : orthophosphate glucosyl-transférase).

Les vitesses initiales mesurées en présence de différentes concentrations en phosphate et en glycogène sont rassemblées ci-dessous :

Phosphate (mM)	Vitesses initiales (μ moles de glucose-1-P formé par min et par mg de protéines)					
	Glycogène (mg/ml)	3,2	8,0	16,0	24,0	48,0
6		12,0	18,0	21,0	23,0	25,0
15		24,0	35,5	43,0	46,0	49,0
30		35,5	53,0	64,0	68,5	74,0
45		43,0	64,0	77,0	82,0	88,0
60		47,5	71,0	85,0	91,5	98,5

- A partir d'un des 2 graphes primaires, déterminer le mécanisme de la réaction, la vitesse maximale et la constante de Michaelis vis-à-vis de chaque substrat.





Cinétique d'inhibition enzymatique

III- Cinétiques d'hydrolyse de l'o-nitrophényl β -D galactoside par la β -galactosidase d'*Escherichia coli*.

L'hydrolyse de l'o-nitrophényl β -D-1-galactoside (ONPG) à pH = 7,7 et 25 °C est mise en évidence par la formation de l'o-nitrophénol caractérisé par une couleur jaune. La cinétique est suivie par mesure d'absorbance à 410 nm.

Ces cinétiques ont été étudiées en absence ou en présence de l'un des inhibiteurs suivants :

o-nitrophényl- β -D-1-thiogalactoside (ONPTG), maltose (Glc α 1-4 Glc), mélibiose (Gal α 1-6 Glc).

S_0 (M)	v ss inhibiteur	v [ONPTG] = $3 \cdot 10^{-4}$ M	v [maltose] = 0,26 M	v [mélibiose] = 0,17 M
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,033	0,018	0,017	0,027
$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,055	0,033	0,028	0,041
$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,083	0,055	0,041	0,055
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,118	0,091	0,059	0,069
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,138	0,118	0,069	0,075
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,150	0,138	0,075	0,079

Les vitesses initiales sont exprimées en variation d'absorbance à 410 nm par minute

- Tracer les courbes de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en substrat pour chacune des expériences et en déduire le type d'inhibition exercé par l'ONPTG, le maltose et le mélibiose.
- Déterminer les valeurs correspondantes $V_{\max \text{ app}}$, $K_m \text{ app}$ et K_I ainsi que celles de V_{\max} , et K_m
- Calculer la constante catalytique (k_{cat} en s^{-1}) sachant que la concentration en β -galactosidase est égale à $1,19 \cdot 10^{-9}$ M et que le coefficient d'extinction molaire de l'o-nitrophénol ($\epsilon_{410\text{nm}}$) est de $3\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Quelle concentration de substrat utiliseriez-vous pour montrer l'effet de chaque type d'inhibiteur sur l'activité enzymatique ?

IV- Réaction d'oxydation catalysée par la polyphénoloxydase d'aubergine

La vitesse initiale de l'activité de la polyphénoloxydase est déterminée pour 4 concentrations en substrat, le pyrocathécol, et en présence de 4 concentrations en cyanure de potassium.

		Vitesses initiales ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)				
		KCN (μM)	2,63	26,30	131,00	263,00
Pyrocathécol						
(mM)						
26,3			92,5	65,8	37,3	24,2
52,6			100,0	73,6	43,1	28,4
79,0			104,0	78,1	46,2	29,8
105,0			110,0	80,0	47,1	30,9

A partir des 2 figures ci-dessous :

- Quel est l'effet du cyanure de potassium sur la réaction ?
- Déterminer les valeurs des constantes cinétiques de la réaction à partir de la figure 2.

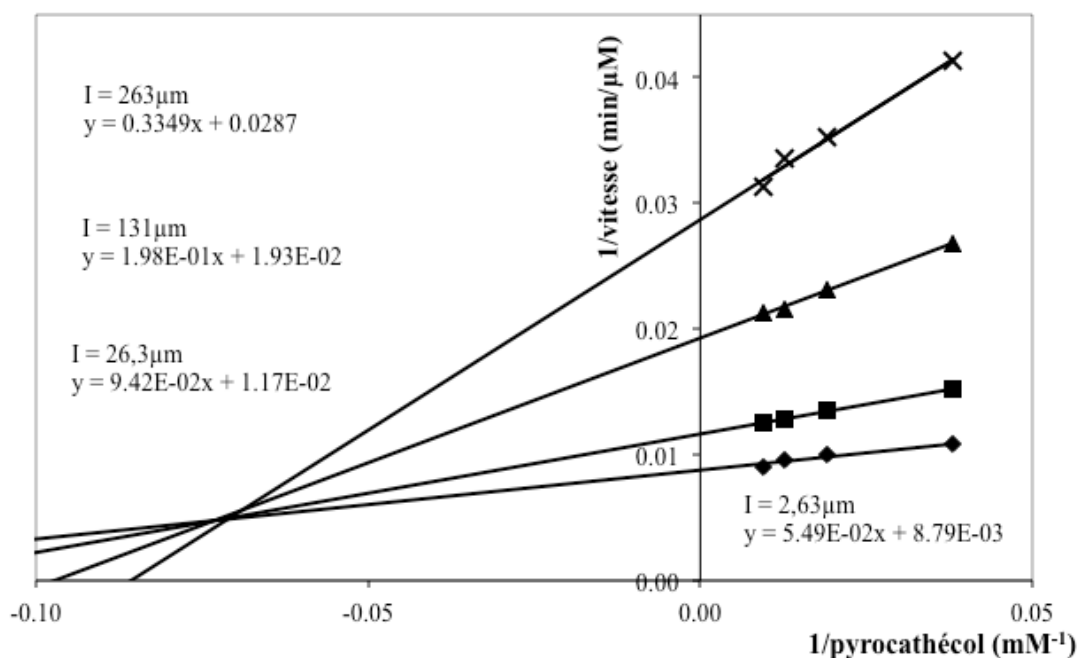


Figure 1 : Représentation en double inverse

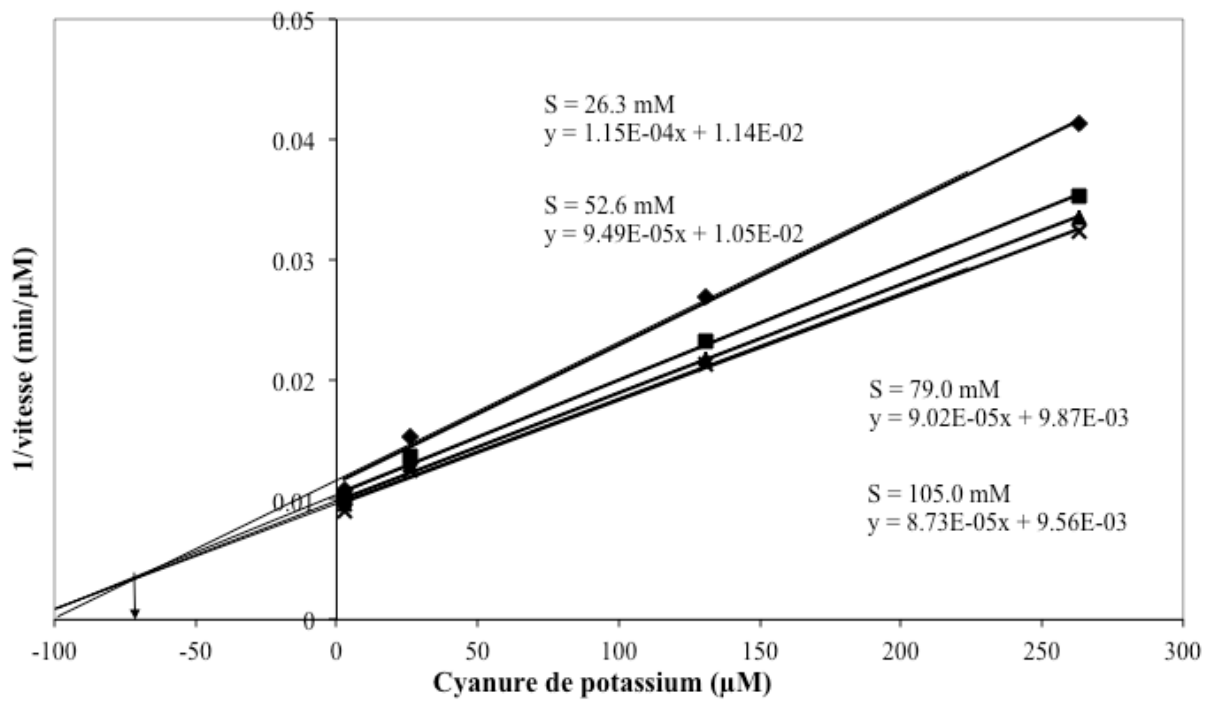


Figure 2 : Représentation de Dixon

V- La D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de muscle de lapin

La D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, de poids moléculaire 136 000, est un tétramère constitué de quatre sous-unités identiques portant chacune un site actif. Elle catalyse la réaction suivante :



Son activité est suivie par l'apparition de NADH suivi par absorbance à 340 nm (le coefficient d'extinction molaire du NADH, ϵ est égal à $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les valeurs des vitesses initiales, exprimées en variation d'absorbance par minute ($\Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$), obtenues pour différentes concentrations de NAD^+ , sont rassemblées dans le tableau :

NAD^+ (μM)	6	10	20	50	100	200
V ($\Delta A_{340} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,034	0,051	0,082	0,125	0,156	0,178

Le mélange réactionnel (3 ml) contient 10^{-3} M de D-glycéraldéhyde-3-phosphate, 10^{-2} M de phosphate, $0,68 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'enzyme. La réaction est réalisée à pH 8,5 et à 25°C .

- Déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme.

Afin d'évaluer l'effet de l'acide iodo-acétique sur l'activité enzymatique, 10^{-8} M d'acide iodo-acétique est ajouté à la solution d'enzyme. Après une incubation d'une heure à pH 8,5 et à 25°C , l'activité résiduelle est mesurée comme précédemment.

NAD^+ (μM)	6	10	20	50	100	200
V ($\Delta A_{340} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,017	0,025	0,041	0,062	0,078	0,088

- Que pouvez-vous déduire de ces résultats ?

VI- La polyphénol-oxydase de champignon

L'activité de la polyphénol-oxydase est mesurée en présence de différentes concentrations initiales en substrat, le catéchol.

S (M)	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,08	0,12	0,18	0,26
v (DO. min ⁻¹)	0,30	0,50	0,72	0,80	0,88	0,91	0,85	0,81	0,70	0,62

- Déterminer le type d'inhibition, les paramètres cinétiques et les constantes d'inhibition

Effet du pH

VII- Effet du pH sur les formes ionisées d'une enzyme

Proposez le schéma réactionnel d'une réaction catalysée par une enzyme michaelienne dont les variations de pH n'affectent que l'ionisation de l'enzyme libre.

En déduire l'équation de vitesse.

Que devient l'expression de la vitesse lorsque $[H^+] \gg K_1$? Comment pouvez-vous interpréter l'action des ions (H^+) ?

VIII- Effet du pH sur le substrat

On suppose que l'activité d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat neutre est indépendante du pH lorsque celui-ci varie de 6 à 8 ; par contre, pour ce même intervalle de pH, l'activité enzymatique devient sensible lorsqu'un substrat comprenant un groupement imidazole est utilisé (tableau).

pH	K_m (mM)	V_{max} ($\mu M \cdot min^{-1}$)
8,0	1,1	75
7,5	1,3	80
7,0	2,0	77
6,5	4,2	83
6,0	11,0	75

- Décrire les effets de la variation du pH sur K_m et V_{max} .
- Comment peut-on interpréter les résultats obtenus ? Proposer un schéma réactionnel compatible avec ces résultats. Donner l'expression de la vitesse et déterminer K_e , la constante de dissociation du complexe substrat- H^+ .

Effet de la température

IX- L'effet de la température sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la polyphénoloxydase de poire est étudié pour différents temps et 4 températures de traitement.

En absence de tout traitement, la vitesse initiale est de $25 \mu\text{moles d'oxygène consommé.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

- Calculer les valeurs des constantes de vitesse d'inactivation thermique pour ces 4 températures et en déduire la valeur de l'énergie d'activation de la réaction d'inactivation thermique.
- Calculer le temps de réduction décimale (D) et le coefficient de destruction thermique (Z).

Durée du traitement (min)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol d'O}_2 \text{ consommé.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)			
	80°C	83°C	85°C	90°C
0,5		20,00	17,80	11,00
1	18,75	15,90	13,00	5,00
2	14,50	10,00	6,70	1,00
3	11,00	6,40	3,50	
5	6,50	2,60	1,00	
7	3,75	1,04		
9	2,25			

