# **TD n° 01 : Enzymologie**

**Troisième année Biochimie (2021)**

**1- Unités d’activité enzymatique**

L’activité enzymatique étant le caractère essentiel de tous les enzymes. Elle sert à en définir les unités.

1. **Unité standard ou unité internationale (UI)** : c’est la quantité d’enzymes nécessaire pour catalysée la transformation de 1 micromole de substrat par minute.

1. **Katal :** c’est la quantité d’enzymes nécessaire pour catalysée la transformation de 1omole de substrat par seconde.

1. **Activité spécifique (AS) :** c’est le nombre d’unité internationale par mg protéine. Sert pour vérifier la pureté de l’enzyme.

1. **Facteur de purification (FP)** **:** AS après purification /AS avant purification.

1. **Le rendement de purification** **(RP) :** est le rapport, exprimé en pourcentage, entre l'activité enzymatique totale après une étape de purification et l'activité enzymatique totale avant l'étape de purification.

**التمرين الأول:**

**تمت عملية تنقية لإنزيم معينE . و بعد قياس النشاط الإنزيمي.**

**كانت النتائج في المرحلة الأولي: 5000 UI لكل 001 مغ بروتين.**

**أما المرحلة الثانية فكانت: 500 UI لكل 1 مغ بروتين.**

**احسب النشاط النوعي للإنزيم (Activité spécifique) في المرحلتين.**

**ما معامل التنقية للمرحلة الثانية مقارنة بالأولى.**

# AS1 = 5000 × 1 / 200 = 25 :المرحلة الأولي

**المرحلة الثانية: 500 = AS2 = 500 × 1 / 1**

**معامل التنقية هو 500 / 25 = 20 مرة**

**Exercice 02 :** Compléter le tableau suivant : Sachant que le **FP** de la première étape est de **1** et **RP** de la première étape est de **100**.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Etape de purification**  | **Activité en UI**  | **Quantité de protéine (mg)**  | **A S**  | **F P**  | **RP %**  |
| 1  | 7286  | 11050  |   | 1  | 100  |
| 2  | 5959  | 4018  |   |   |   |
| 3  | 4346  | 530.4  |   |   |   |
| 4  | 2968  | 274  |   |   |   |
| 5  | 1748  | 19.9  |   |   |   |
| 6  | 1224  | 6.9  |   |   |   |

 **Exercice 03 :** Une enzyme a été purifiée en trois étapes, en partant de 1000 g d'un extrait brut contenant au total 20000 unités de cette enzyme.

**1 -** Compléter le tableau ci-dessous

**2 -**Quelles conclusions peut-on tirer de cette étude ?

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|   | protéine (g)  | activité (UE)  | taux de purification  | **A S** | rendement  |
| Extrait brut | 1000 | 20000 |  |  |  |
| Chromato. d'exclusion | 200 | 14000 |  |  |  |
| Chromato. d'échange d'ions | 15 | 4500 |  |  |  |
| Chromato. d'affinité | 0,5 | 3500 |  |  |  |

**Correction :**

Afin de remplir le tableau, il faut connaître quelques définitions :
- **L'activité spécifique (AS)**: représente un nombre d'unités enzymatiques (UE) par gramme de protéines (g) : **AS = (UE /mg)**

**- Le taux de purification**: d’une enzyme est le rapport de l'AS mesurée après une étape de purification, sur l'AS mesurée à l'étape précédente :

**Taux de purification =** AS après une étape / AS avant cette même étape

- **Le rendement**: correspond à un nombre d'UE mesuré après une étape de purification, sur un nombre d'UE mesuré à l'étape précédente. **Rendement = UE après une étape / UE avant cette même étape**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | protéine (g) | activité (UE) | **AS**  | taux de purification : | rendement : |
| Extrait brut | 1000 | 20000 | **20** | - | - |
| Chromato. d'exclusion | 200 | 14000 | **70** | 3,5 fois | 70 % |
| Chromato. d'échange d'ions | 15 | 4500 | **300** | 4,28 fois | 32 % |
| Chromato. d'affinité | 0,5 | 3500 | **7000** | 23,3 fois | 77,7 % |

On pourra utilement calculer :
- **Le taux global de purification**, qui est égal à l'AS mesurée à la fin de toutes les étapes, divisée par celle de départ. Ici, le **taux global de purification est égal à 7000 / 20 = 350.**- **Le rendement global** qui est égal à 3500 / 20000 = 17,5 %,
**Conclusion :** Suite aux différentes étapes de purification, on a pu récupérer 3500 unités, sur les 20000 que l'on avait au départ, soit 17,5 %. L'enzyme a été purifiée 350 fois. es en 1992 et continu d'augmente.

**Exercice 4 : Purification et caractérisation d’une enzyme bactérienne E sécrétée par *Bacillus halodurans***

L’enzyme E est purifiée à partir du surnageant de culture débarrassé des bactéries par centrifugation selon un protocole contenant trois étapes (Table 1). Le surnageant de culture centrifugé est soumis à une précipitation au sulfate d’ammonium.

Le précipité est récupéré par centrifugation, resolubilisé, dialysé contre un tampon Tris-HCl 50 mM pH 9 (tampon A) et chargé sur une colonne de DEAE-cellulose (chromatographie échangeuse d’anions).

 L’élution des protéines est réalisée à l’aide d’un gradient de 0 à 1 M NaCl dans le tampon A. Les fractions contenant l’enzyme sont regroupées, concentrées et chargées sur une colonne de séphadex G50 équilibrée en tampon A (chromatographie d’exclusion).

L’élution des protéines est réalisée avec le tampon A. Les fractions contenant l’enzyme sont regroupées et constituent le pool d’enzyme purifiée. Les fractions issues des différentes étapes de purification sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturantes.

Le pool d’enzyme purifiée a été utilisé comme source d’enzyme pour étudier son activité sur un substrat spécifique et les résultats sont reportés dans la table 2.

Table 1 : Bilan des étapes de purification de l’enzyme E

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  **Etapes**  | **Activité enzymatique totale (U)**  | **Quantité de protéine totale (mg)**  | **Activité spécifique** **(U/mg)**  | **Facteur de purification**  | **Rendement de purification (%)**  |
| **Surnageant culture centrifugé**  | **1413**  | **673**  |  |  |  |
| **Précipitation sulfate** **d’ammonium**  | **1215**  | **308**  |  |  |  |
| **Chromatographie échangeuse d’anions**  | **438**  | **17,4**  |  |  |  |
| **Chromatographie d’exclusion**  | **342**  | **10**  |  |  |  |

**2- NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION DES ENZYMES**

 Avant 1961, les enzymes ont été dénommées selon le **nom du Substrat sur** lequel elles agissent en ajoutant le suffixe "**ase**".

Il existe deux types de **NOMENCLATURE**

Avant de donner les bases des deux types de classification, rappelons brièvement les **propriétés des enzymes :**
1- sont des protéines, de masse moléculaire élevée, thermolabiles, biocatalyseurs des
réactions métaboliques.
2- agissent à des concentrations très faibles.
3- possèdent une spécificité étroite ou lâche avec le substrat.
4- augmentent la vitesse des réactions sans modifier leur état d’équilibre.
5- doivent être régénérées à la fin de la réaction ou de la séquence des réactions.

**2.1 – FONCTIONNELLE**Elle est très utilisée. Elle prend en compte le **nom du substrat** de l’enzyme et le **type
de réaction catalysée**. Pour désigner une enzyme on indique :
1- d'abord le nom du substrat
2- puis le type de réaction catalysée
3- on ajoute enfin le suffixe ase.
*Par exemple :*- glucose-6-phosphate isomérase
- Isocitrate lyase
- pyruvate carboxylase

Lorsque l'enzyme **utilise 2 substrats** on les désigne tous les deux en indiquant
1- le substrat donneur de radicaux
2- puis le substrat accepteur du radical libéré
3- le radical échangé
4- le type de réaction
5- on ajoute enfin ase.
Exemple : - ATP-glucose phosphotransférase
- UDPglucose-fructose glucosyltransférase
- Glutamate pyruvate aminotransférase.
**2.2 - NOMENCLATURE OFFICIELLE DES ENZYMES**Depuis 1961, l'Union Internationale de Biochimie a codifié la nomenclature et la
classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle. Toutes les enzymes
actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 4 nombres séparés par
des points et précédés de EC soit (EC x1.x2.x3.x4). La signification des nombres est la suivante :

**X1** : Le premier nombre pouvant varier de 1 à 6 indique le type de réactions
1 : **Oxydoréductases** (transfert d'électrons, d’atomes d’hydrogène ou fixation d’oxygène)
2 : **Transférases (**transfert d'atomes ou de groupes d'atomes autres que ceux 1)
3 : **Hydrolases** (Coupure des liaisons avec fixation de radicaux H et OH issus de l’eau)
4 : Lyases (Coupure des liaisons par d'autres modes autres que l'hydrolyse).
5 **: Isomérases** (réaction conservant la formule brute du composé)
6 : **Ligases** (formation des liaisons entre C et un autre métalloïde en utilisant l'énergie de l'ATP).

**X2** : Le deuxième désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie suivant son
mécanisme d'action. Dans le cas des oxydoréductases on distingue les déshydrogénases, les mono oxygénases et les di oxygénases.

**X3** : Le 3e nombre désigne la nature de la molécule qui sert d'accepteur, lorsqu'il s'agit d'un transfert d'électrons.

**X4** : Le 4e nombre est un numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe.
Lorsqu'une enzyme se termine par 99, cela signifie qu'elle est incomplètement caractérisée.

# **TD n° 02 :**

#  **Enzymologie (Cinétique enzymatique à un substrat – absence d’inhibiteurs)**

 **Exercice 1 :** La phosphatase alcaline(PAL) catalyse l’hydrolyse les mono-esters phosphoriques. Le substrat est le nitro-4-phényl-phosphate de sodium.

 La réaction est suivie en dosant par la spectrophotométrie le nitro-4-phénol libéré par hydrolyse du substrat. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  Substrat (mol/ L)  | 2× 10 -4  | 4× 10-4  | 1 × 10-3  |
| Vitesse  | 0.178  | 0.278  | 0.416  |

1- Ecrire sans la démontrer, l’équation de Michaelis et Menten. 2- Donner la définition des Km et Vmax.

2-A partir de graphe déterminer Km et Vmax.

 **Exercice 02 :**  En présence de différentes concentrations du substrat nous avons obtenus les résultats suivants :

|  |  |
| --- | --- |
|  (S) mole/l (×10-3) | S transformé (mole/mn) ×  10-3 |
|  1 |  3.3 |
|  2 |  5 |
|  4 |  6.6 |
|  8 |  8 |

 Calculer les caractéristiques cinétiques.

 **Exercice 03 :** La figure ci-dessous montre les résultats d’une cinétique d’une enzyme **E1** normale et de l’enzyme mutée **E2**.

 **E2** ne diffère d’**E1** que par la substitution d’une radicale valine par un autre acide aminé.

1. Commenter l’affinité d’**E1** et **E2** pour S.

Une électrophorèse à pH 7 montre qu’**E2** migre plus rapidement vers l’anode.

Quels acides aminés ont pu remplacer la valine dans la séquence de l’enzyme mutée ?

1/v

E1

E2

1

/s

**Exercice 04 :**

Une lactase sert de matériel expérimental. Aux concentrations données de lactose, les vitesses initiales de la réaction sont les suivantes :

|  |  |
| --- | --- |
| Substrat × 10-4 M  | vi M /min  |
| 50  | 155  |
| 20  | 103  |
| 10  | 68.5  |
| 7  | 53  |
| 5  | 40.6  |

1-Déterminer graphiquement les constantes cinétiques.

 2. Sachant que la masse moléculaire de cette lactase est 135 000 Da (135 × 106 mg) calculer l’activité spécifique.

**Correction :** **vmax** = 217.10-6 mol.min-1.mg

 **KM** = 22.10-4 mol.L-1

La lactase pèse 135 000 g = 135.106 mg.mol-1 donc pour une mol d’enzyme :

 **Activité spécifique** = 217.10-6 x 135.106 = 29 300 mol.min-1.mol-1 d’enzyme.

|  |
| --- |
| **Exercice 05 :** On suit la cinétique d'hydrolyse d'un substrat par une enzyme en mesurant l'absorbance du produit apparu. Les valeurs des vitesses initiales sont les suivantes (U.A. = Unité d'Absorbance) : |

|  |  |
| --- | --- |
| [S0] (M) | vi (U.A.min-1) |
| 5 10-5 | 0,32 |
| 1 10-4 | 0,56 |
| 2 10-4 | 0,32 |
| 5 10-4 | 0,56 |
| 1 10-3 | 0,32 |
| 2 10-3 | 0,56 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Déterminez les paramètres cinétiques Vmax, KM .

|  |  |
| --- | --- |
| **Vmax = 1,69**  |  **KM = 213 µM** |

Enzymology kinetics parameter kcat KM Vmax Vm catalytic center enzyme Lineweaver Burk enzymologie biochimej : |
| **Exercice 06 :** 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 vi (µM.min-1) | 0,040 | 0,078 | 0,124 | 0,160 | 0,205 |
| E2 vi (µM.min-1) | 0,270 | 0,280 | 0, 275 | 0,280 | 0,285 |

|  |
| --- |
| Tracez la courbe vi = f ([S0]). Quelles conclusions pouvez-vous en tirer ?  |
| **Exercice 07 :** 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 g.mol-1) qui libère du paranitrophénol (M. M. = 139 g.mol-1) qui absorbe à 410 nm avec un coefficient d'extinction pondéral : ε1% = 1260 g-1.100 mL.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 |
| vi (U.DO.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). **Exercices 8 :** Dans une expérience, on détermine les v0 en fonction de la concentration de substrat (S), et on obtient les résultats suivants :

|  |  |
| --- | --- |
| **[S] µmoles.L-1** | **V0 nkat.L-1** |
| **1** | **16.7** |
| **2** | **28.6** |
| **5** | **50** |
| **10** | **66.7** |
| **40** | **88.9** |
| **50** | **90.9** |
| **100** | **95.2** |
| **200** | **97.6** |

Déterminez les paramètres cinétiques Vmax et KM, à partir de la représentation des doubles inverses.**TD n° 03 :** **(Cinétique enzymatique à un substrat – présence d’inhibiteurs)** **Exercice 01 : 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 5 mM. (E) est le même dans chaque expérience.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| S (mM)  | (1) v (μ mol/ml/s)   | (2) v (μ mol/ml/s)   | (3) v (μ mol/ml/s)   |
| 1  | 12  | 4,3  | 5,5  |
| 2  | 20  | 8  | 9  |
| 4  | 29  | 14  | 13  |
| 8  | 35  | 21  | 16  |
| 12  | 40  | 26  | 18  |

1. Déterminez Vmax et *K*m de l’enzyme.
2. 2- Déterminez le type d’inhibition et le K i

 **Exercice 02 :** On se propose d’étudier les caractéristiques de la L-thréonine désaminase d’une bactérie, enzyme qui catalyse la transformation de la L-thréonine en alphacétobutyrate (première étape de la biosynthèse de la L-isoleucine). Dans une première expérience, la vitesse initiale v0 est mesurée en présence de concentrations variables en L-thréonine [S] pour une valeur d'enzyme E donnée. * 1. **Déterminer KM et Vmax.**

|  |  |
| --- | --- |
| [S] 10-3 (M)  | v0 (µmoles.L-1.min-1.)  |
| 5,00  | 312  |
| 2,50  | 227  |
| 1,66  | 178  |
| 1,25  | 149  |
| 1,00  | 125  |

 Dans une seconde expérience, on mesure v0  pour différentes concentrations en L-Thr en présence de concentrations fixées de D-allothréonine d’une part, et de Lisoleucine d’autre part.

|  |  |
| --- | --- |
|  [S].10-3 (M)  | v0 (µmoles.L-1.min-1.)  |
| D-allothréonine (10-2 M)  | L-isoleucine (10-3 M)  |
| 5,00  | 200  | 96  |
| 2,50  | 130  | 70,5  |
| 1,66  | 96  | 55  |
| 1,25  | 74  | 45,5  |
| 1,00  | 62  | 38,5  |

* 1. Déterminer les nouveaux paramètres cinétiques.
	2. Expliquer l’effet de la D-allothréonine et de la L-isoleucine sur la réaction.

**Exercice 3 :** Les résultats suivants sont obtenus au cours d’une réaction enzymatique, (1) en l’absence d’inhibiteur, (2), (3) et (4) en présence de trois inhibiteurs. A-Déterminez Vmax et Km de l’enzyme.  B-Déterminez le type d’inhibition.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  S ( mM ) | Vi (absence d’inhibiteur) |  Vi (2)  |  Vi (3) |  Vi (4)  |
|  2.5\*10-5 |  0.033 |  0.018 |  0.0165 |  0.027 |
|  5\*10-5 |  0.055 |  0.033 |  0.0275 |  0.041 |
|  1\*10-4 |  0.0825 |  0.055 |  0.041 |  0.055 |
|  2.5\*10-4 |  0.118 |  0.091 |  0.059 |  0.069 |
|  5\*10-4 |  0.138 |  0.118 |  0.069 |  0.075 |
|  1\*10-3 |  0.150 |  0.138 |  0.075 |  0.079 |

  **Exercice 4 :** La glutamate déshydrogénase est une enzyme michaélienne. On teste l’effet du salicylate sur cette enzyme.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Glutamate mM  | 1.5  | 2  | 3  | 4  | 16  |
| Vi sans salicylate  | 0.21  | 0.25  | 0.28  | 0.33  | 0.5  |
| Vi avec salicylate  | 0.08  | 0.1  | 0.12  | 0.13  | 0.19  |

1. Déterminez graphiquement à l'aide des données suivantes le type d’inhibition.
2. Calculez les constantes cinétiques Vmax et KM de l’enzyme.
3. Calculez le Ki du salicylate.

**Exercice 5 :** **S** et **I** sont respectivement un substrat et un inhibiteur d’une enzyme. On mesure v (μmol de S consommé par minute) pour différentes concentrations initiales en S, en Absence et en présence de I.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **S ×10-3 M**  | **Vi sans I** **× 10-6 M**  | **Vi avec I** **× 10-6 M**  |
| 1  | 0.290  | 0.167  |
| 1.5  | 0.380  | 0.230  |
| 2.5  | 0.510  | 0.330  |
| 5  | 0.690  | 0.500  |
| 10  | 0.800  | 0.670  |
| 20  | 0.900  | 0.800  |

A-Déterminez Vmax et Km de l’enzyme.  B-Déterminez le type d’inhibition. **TD n° 04 :****(Cinétique enzymatique à deux substrats)****Exercice 1 :**  La glycogène- phosphorylase (α – 1,4 glucane : orthophosphate glucosyl transférase) à été étudiée par cinétique, afin de déterminer le mécanisme de la réaction. On a mesuré les vitesses initiales de la réaction, exprimés en (micro mole / min) et par mg de protéine, en fonction de la concentration des deux substrats :

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Phosphate****(mM)** |  |  | **Glycogène (mM)** |  |  |
| **3.2** | **8** | **16** | **24** | **48** |
| **6** | 12 | 18 | 21 | 23 | 25 |
| **15** | 24 | 35.5 | 43 | 46 | 49 |
| **30** | 35.5 | 53 | 64 | 68.5 | 74 |
| **45** | 43 | 64 | 77 | 82 | 88 |
| **60** | 47.5 | 71 | 85 | 91.5 | 98.5 |

Déterminer le mécanisme de la réaction, la vitesse maximale et les Km des deux substrats.  **Exercice 02** : La [phospholipase A2](http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/TexteTD/6ModuleS5BG2/5VoieAcidArachidon/1VoieAcidArachidon.html) catalyse l'hydrolyse de l'acide gras estérifié en position 2 des 12-diacylphosphoglycérides en présence d'ion calcium. On mesure les vitesses initiales d'hydrolyse de la dibutyryl-lécithine (DBL), à différentes concentrations de ce substrat et de calcium. La réaction est suivie en titrant l'acide libéré par la soude et les résultats, en µmoles d'acide libéré.min-1.mg-1 de phospholipase, sont les suivants :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **[DBL] (mM)** |  | **[Ca2+] x 106 (M)** |  |
| **25** | **50** | **100** | **200** |
| **11,4** | **0,60** | **0,83** | **1,00** | **1,15** |
| **22,7** | **1,07** | **1,40** | **1,70** | **1,85** |
| **34** | **1,45** | **1,85** | **2,15** | **2,35** |
| **45,4** | **1,75** | **2,20** | **2,50** | **2,70** |

 Déterminer le mécanisme et les paramètres cinétiques de cette réaction. **Exercice 03 :** Une enzyme catalyse une réaction selon un mécanisme ordonné. On mesure la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations de l'un des substrats (X) en maintenant fixe la concentration de l'autre substrat (Y), et inversement. Les résultats, exprimés en µM.min-1, sont les suivants :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **[X] (mM)** |  | **[Y] (µM)** |  |
| **3** | **5** | **10** |
| **0,33** | **0,017** | **0,025** | **0,039** |
| **0,67** | **0,024** | **0,033** | **0,038** |
| **5** | **0,034** | **0,047** | **0,061** |

1. En n'utilisant que les deux représentations primaires, déterminer les paramètres cinétiques auxquels vous avez accès.
2. En déduire l'ordre de fixation des substrats. Quel paramètre cinétique n'est pas déterminé ?

 **Exercice 04** : Une enzyme catalyse une réaction entre deux substrats A et B. Nous avons effectués différentes mesures de vitesse initiale en présence de concentrations variables des substrats, On a obtenu les résultats suivants :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Concentration de A (M)** |  | **Concentration de B (10-3 M)** |  |
| **1** | **2** | **5** | **10** | **20** |
| **1** | 0.5 | 0.7 | 1 | 1.1 | 1.25 |
| **2** | 0.57 | 0.9 | 1.37 | 1.65 | 1.8 |
| **5** | 0.62 | 1 | 1.73 | 2.2 | 2.6 |
| **10** | 0.65 | 1.1 | 1.9 | 2.5 | 2.9 |
| **20** | 0.66 | 1.15 | 2 | 2.7 | 3.2 |

Déterminer le mécanisme de la réaction, la vitesse maximale et les Km des deux substrats **Exercice 05** : La chélatase est un enzyme qui catalyse l’insertion du fer dans les pro-phyrines pour former les hèmes ; le fer peut être remplacé par du cobalt ou du zinc. Nous avons effectués différentes mesures de vitesse initiale en présence de concentrations variables des substrats, On a obtenu les résultats suivants :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  **Cobalt (Micro M)** |  | **Protoporphyrine (Micro M)** |  |
| **2.3** | **.3.3** | **5** | **10** |
| **4** | 2.7 | 3.2 | 3.9 | 4.9 |
| **6** | 3.5 | 4.1 | 5 | 6.3 |
| **8** | 4.1 | 4.8 | 5.8 | 7.35 |
| **10** | 4.55 | 5.3 | 6.5 | 8.2 |

Déterminer le mécanisme de la réaction et les paramètres cinétiques correspondants. **Exercice 06**: L’Héxokinase cytoplasmique du cerveau catalyse la formation de glucose-6-P à partir du glucose et de l’ATP-Mg+2. Pour élucider le mécanisme cinétique, on a mesuré les vitesses de cette réaction à différentes concentrations de S.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ATP-Mg+2 mM** |  |  | **Glucose mM** |  |  |
| **0.033** | **0.04** | **0.05** | **0.067** | **0.10** |
| **0.1** | 0.59 | 0.67 | 0.76 | 0.88 | 1 |
| **0.15** | 0.8 | 0.9 | 1 | 1.2 | 1.4 |
| **0.2** | 0.98 | 1.1 | 1.25 | 1.45 | 1.7 |
| **0.33** | 1.3 | 1.5 | 1.7 | 2 | 2.3 |

Déterminer le mécanisme de la réaction et les paramètres cinétiques correspondants.**Pr. Ouldjaoui Abdallah****Dr. Boujouraf Mourad** |