

Wageningen Agricultural University

From the Selected Works of Pr. Mamoudou H. DICKO, PhD

Winter January 29, 2016

TD Enzymo L3S5_2016.pdf

Mamoudou H. DICKO, Prof.



Available at: <https://works.bepress.com/dicko/S2/>

Exercice 1

La loi de vitesse d'une réaction de transformation d'une substance x peut être exprimée, par :

$$v = - \frac{d[x]}{dt} = k[x]^n$$

Où x est la substance qui disparaît, n l'ordre de la réaction, t le temps de la réaction et k, la constante cinétique. Déterminer les unités de la constante de vitesse k lorsque n=0, 1, 2, 3, sachant que la vitesse de la réaction est exprimée en $M^{-1} s^{-1}$.

Exercice 2

Soit la réaction du premier ordre :



Au temps t=0, $[A_0]=10^{-3}M$. Au temps t=5s, $[A]=1,2 \cdot 10^{-4}M$

- 1) Calculer la constante de vitesse de la réaction
- 2) Calculer [A] au temps t=12 s

Exercice 3

On étudie la réaction suivante :



en mesurant la concentration de A en fonction du temps.

t (min)	1	2	3	6	10	14	20	26	33	40
[A] (mM)	5	4,82	4,7	4,25	3,76	3,3	2,6	2	0,94	0,15

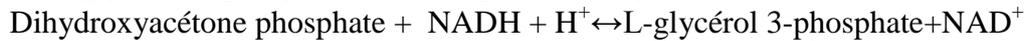
a) Tracer la représentation de la concentration de A en fonction du temps. Commentez cette représentation.

Déterminez l'ordre de la réaction par rapport à A et la constante de vitesse de la réaction de transformation de la substance A.

- b) Calculer la concentration de A restant et de produit P formé au bout d'une heure de réaction si la concentration de départ de la substance A est de 10 mM.
- c) Calculer la demi-vie de la réaction.

Exercice 4

La L-glycérol 3-phosphate déshydrogénase catalyse la réaction :



Le coefficient d'extinction molaire du NADH est de $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, à 340 nm. Les autres composés n'absorbent pas à 340 nm. On fait réagir de la dihydroxyacétone phosphate et du NADH, dans un volume final de 1 ml, dans une cuve dont le trajet optique est 1 cm. On suit la réaction, à 340 nm. Avant l'addition de L-glycérol 3-phosphate déshydrogénase, l'absorbance est 0,5. On ajoute alors une quantité convenable de L-glycérol 3-phosphate déshydrogénase.

A l'issue de la réaction, l'absorbance est quasi-nulle.

Combien de moles de NADH ont été consommées ?

Exercice 5

Une enzyme E catalyse la réaction d'hydrolyse: $\text{A} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{B} + \text{C}$

On suit la cinétique d'apparition du produit C, pour différentes concentrations en substrat A.

Les valeurs obtenues (en μmoles de C par tube) sont présentées dans le tableau suivant:

Temps (min)	[S0] (mM)			
	10	30	100	150
0	0	0	0	0
2,5	0,9	1,9	3,2	3,6
5	1,8	3,9	6,4	7,1
7,5	2,5	5,6	9,6	10,7
12,5	3,7	7,6	15,2	17,6
17,5	4,4	9,1	18,3	

1. Représentez les cinétiques et déterminez la vitesse initiale de chacune d'elle. Dans quelle condition de concentration du substrat A s'est-on placé pour suivre ces cinétiques?

Pourquoi ne se préoccupe-t-on pas de la concentration de l'eau ?

2. Tracez la courbe de saturation et commentez-la. Déterminez les paramètres cinétiques de l'enzyme à partir de cette représentation.

3. Déterminez les paramètres cinétiques à l'aide de la représentation des doubles inverses. Expliquez la différence entre les valeurs déterminées à partir de ces deux représentations.

4. Les réactions enzymatiques sont effectuées dans un tube contenant 1 ml de la solution d'enzyme à une concentration initiale de $3 \mu\text{M}$, le volume réactionnel étant complété par 2 ml

de substrat dans le tampon approprié. Calculez les valeurs des paramètres cinétiques (exprimez la concentration en molarité).

5. Une unité d'enzyme (U) est la quantité qui hydrolyse 1 μ mole de substrat par minute. Par ailleurs, l'activité spécifique d'une enzyme est le rapport de l'activité maximale de l'enzyme à sa concentration (exprimée en mg/ml) dans le milieu réactionnel. Enfin, la masse molaire de l'enzyme E est de 100.000 dalton. Calculez l'activité spécifique en $U \cdot mg^{-1}$.

6. On considère que l'enzyme a été totalement purifiée. Calculez la valeur de la constante catalytique (k_{cat}) en s^{-1} .

7. Si l'enzyme E est une enzyme dite "Michaélienne", à quelle constante du schéma réactionnel classique pour une telle enzyme correspond cette constante ? Expliquez-en les unités.

Retrouvez les unités de K_m sur la base de celles des constantes de vitesse k_1 , k_{-1} et k_2 .

Exercice 6

L'invertase hydrolyse le saccharose en glucose et fructose.

On détermine la vitesse d'hydrolyse du saccharose par l'invertase dans les conditions initiales. Il apparaît $50 \cdot 10^{-3}$ moles de fructose en 5 minutes. On a introduit dans le milieu 1 mL de solution enzymatique dont la teneur en protéines est de $2,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

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

Exercice 7

La lactase (β -galactosidase, E.C. 3.2.1.23) hydrolyse le lactose en glucose et galactose.

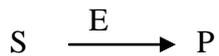
On détermine la vitesse d'hydrolyse du lactose par la lactase (dans les conditions initiales). Il apparaît $0,672 \times 10^{-2}$ moles de glucose en 10 min. On a introduit dans le milieu 1 mL de solution enzymatique dont la teneur en protéines est de $2,85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

- 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 $UI \cdot \text{mL}^{-1}$ et en $Kat \cdot \text{mL}^{-1}$

- d) Calculer l'activité spécifique de l'enzyme en UI mg^{-1} et en Kat mg^{-1}
- e) Calculer l'activité molaire spécifique en considérant que l'on est en présence d'une enzyme pure (PM = 135000 Da).

Exercice 8

Une enzyme E est constituée de 2 sous-unités identiques de poids moléculaires voisins de 50 000 Da. La réaction catalysée est :



On dispose d'un extrait de E contenant 3 mg de protéines par mL et dans lequel l'enzyme est pure à 80 %. La détermination d'activité est réalisée par spectrophotométrie à 512 nm, longueur d'onde à laquelle le produit P absorbe mais non le substrat S. Le coefficient d'absorption molaire du produit est égal dans les conditions de la mesure à $5\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. La cuve utilisée a une largeur de 1 cm.

Le milieu réactionnel, tamponné à pH 7 et thermostaté à 30 °C, contient une concentration saturante en substrat. Son volume est de 3 mL. On utilise pour la détermination 100 μL d'extrait de E diluée au 500^{ème}. On arrête la réaction en ajoutant 2 ml de réactif d'arrêt au milieu réactionnel après 2 minutes de temps de réaction. La variation d'absorbance lue est égale à 0,6 unité d'absorbance.

Calculer la concentration d'activité catalytique dans l'extrait E et l'activité spécifique. En déduire le Turn Over Number à 30 °C et pH 7.

Exercice 9

La glucokinase catalyse la réaction



On donne la constante 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	$1,2 \cdot 10^{-3}$
UTP	$4,5 \cdot 10^{-3}$
CTP	$3,6 \cdot 10^{-3}$

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

Exercice 10

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 à 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] _i en mol.L ⁻¹	V _i avec la glucokinase en μmol.L ⁻¹ .min ⁻¹	[Glucose] _i en mol.L ⁻¹	V _i avec l'hexokinase en μmol.L ⁻¹ .min ⁻¹
5,0.10 ⁻³	1,61	5,0.10 ⁻⁵	0,490
6,7.10 ⁻³	2,00	6,7.10 ⁻⁵	0,575
10,0.10 ⁻³	2,67	10,0.10 ⁻⁵	0,607
20,0.10 ⁻³	2,93	20,0.10 ⁻⁵	0,806
50,0.10 ⁻³	4,17	50,0.10 ⁻⁵	0,893

Déterminer les valeurs de K_M et de V_m pour ces deux enzymes.

Comparer les deux K_M. Conclure.

Comparer les deux V_m. 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 11

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 molaire: = 90 M⁻¹ 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):

[S ₀] (mg/tube)	0	0,26	0,39	0,65	1,5	1,95	3,80
V _i (unité DO/min)	0	0,147	0,167	0,190	0,212	0,231	0,238

Exprimer les concentrations initiales du substrat en mol/Litre (M). Déterminez les valeurs des paramètres cinétiques (K_m et V_m) de cette enzyme vis-à-vis de ce substrat. Calculez l'activité spécifique de l'enzyme.

Exercice 12

L'activité de la malonyl transamylase est inhibée par l'acétyl-coenzyme A. Le tableau donne les vitesses de la réaction (exprimées en unités arbitraires) à différentes concentrations de malonyl-coenzyme A, en présence ou en absence d'acétyl-Coenzyme A.

Malonyl-CoA (μM)	Acétyl-CoA (μM)		
	0	280	450
8,5	0,25	0,1	0,065
17	0,4	0,19	0,12
25	0,5	0,25	0,17
40	0,61	0,35	0,245
60	0,7	0,45	0,33
80	0,8	0,575	0,45

Déterminer le type d'inhibition et le KI correspondant. Que peut-on conclure sur l'effet de la concentration initiale de l'inhibiteur sur le KI expérimental ?

Exercice 14

S et I sont respectivement un substrat et un inhibiteur d'une enzyme. On mesure v_i (μmoles de substrat transformé par min) pour différentes concentrations initiales de S, en l'absence et en présence de I (à la concentration 10^{-6} M).

[S]* 10^2 (M)	I Absent	I Présent
	v_i ($\mu\text{mol. min}^{-1}$)	v_i ($\mu\text{mol. min}^{-1}$)
2	5	2,50
5	7,14	3,57
7,5	7,87	3,95
10	8,34	4,17
20	9,09	4,54

- 1) A l'aide de la représentation de lineweaver-Burk effectuée en l'absence et en présence de I, préciser quel type d'inhibition I exerce sur l'enzyme.
- 2) Déterminer K_m et V_{max} dans les deux cas.
- 3) Calculer la constante de dissociation K_I du complexe enzyme-inhibiteur
- 4)

Exercice 15

On suit la cinétique d'hydrolyse de l'orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) par la β -galactosidase, respectivement en absence d'inhibiteur et en présence d'orthonitrophényl- β -D-thiogalactopyranoside (ONPTG), de maltose (α -D-glucofuranosyl-(1,4)- β -D-glucofuranose) ou de mélibiose (α -D-galactopyranosyl-(1,6)- α -D-glucofuranose).

Les valeurs des vitesses initiales obtenues en suivant la variation de l'absorbance à $\lambda = 410$ nm sont les suivantes :

$[S]_0 (M)$	$\Delta A.min^{-1}$			
	Sans I	$[ONPTG] 3 \cdot 10^{-4} M$	$[maltose] 0,26 M$	$[mélitiose] 0,17 M$
0	0	0	0	0
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,033	0,018	0,016	0,027
$5 \cdot 10^{-5}$	0,055	0,033	0,027	0,041
$1 \cdot 10^{-4}$	0,082	0,055	0,041	0,055
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,118	0,091	0,059	0,069
$5 \cdot 10^{-4}$	0,138	0,118	0,069	0,075
$1 \cdot 10^{-3}$	0,150	0,138	0,075	0,079

a) Que suit-on à $\lambda = 410 \text{ nm}$? Déterminer V_m , K_m et k_{cat} (en s) à l'aide de la représentation de votre choix.

b) Déterminer les paramètres cinétiques $V_m \text{ app}$ et $K_m \text{ app}$ en présence des inhibiteurs. Calculez les constantes K_I .

Expliquer le type d'inhibition observé pour chacun des inhibiteurs de cet exercice.

Données: $[E]_0 = 1,19 \cdot 10^{-9} \text{ M}$; $\epsilon_{ONP} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $l = 1 \text{ cm}$

Exercice 6 (Cours personnel à préparer à la maison)

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.

	protéines (g) :	activités (UE) :	taux de purification	rendement :
Extrait brut	1000	20000		
Chromato. d'exclusion	200	14000		
Chromato. d'échange d'ions	15	4500		
Chromato. d'affinité	0,5	3500		

1/Compléter le tableau suivant :

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