
 Ecole Supérieure de Technologie Béni-Mellal		 جامعة السلطان مولاي سليمان Université Sultan Moulay Slimane
Filière : Agro-industrie	1^{ère} année cycle DUT Module: biochimie	Professeur: Khalid BOUTOIAL
Partie II : Enzymologie Série 1 des Travaux dirigés		

Exercice 1

- a- On considère un système enzyme-substrat fonctionnant dans des conditions de quasi équilibre.

Montrer que l'on peut calculer la concentration du complexe enzyme-substrat connaissant la concentration totale en enzyme (E_T). La concentration initiale en substrat $[S]$ et la constante de Michaelis K_M .

- Calculez les concentrations $[ES1]$ et $[ES2]$ du complexe enzyme-substrat dans les deux cas suivants : $[S1] = 10^{-2}M$, $[S2] = 10^{-4}M$, si $[E_T] = 10^{-8}M$ et $K_M = 10^{-4}M$.

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

Concentration molaire en lactose	V en moles de lactose hydrolysé par min et par mg d'enzymes
$50. 10^{-4}$	$155. 10^{-6}$
$20. 10^{-4}$	$103. 10^{-6}$
$10. 10^{-4}$	$68,5. 10^{-6}$
$7. 10^{-4}$	$53,0. 10^{-6}$
$5. 10^{-4}$	$40,6. 10^{-6}$

- 1) Déterminer graphiquement les constantes de l'équation de Michaelis (K_M et V_{max}) relatives à ce système.

Exercice 2

Le foie de rat contient deux enzymes, l'hexokinase (HK) et la glucokinase (GK), capables de phosphoryler le glucose suivant la réaction :



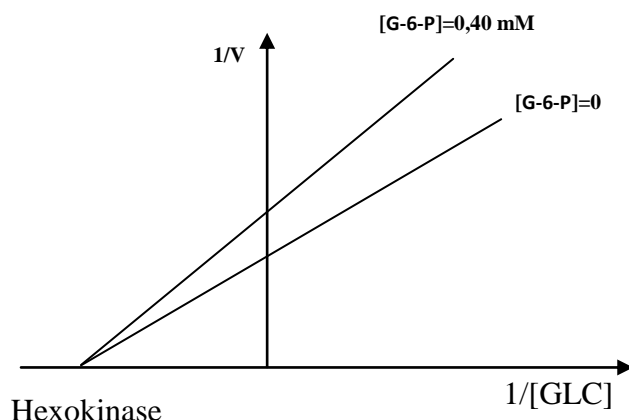
On sépare ces deux enzymes et l'on mesure leur vitesse initiale ($V1$ pour HK, $V2$ pour GK) en fonction de la concentration du glucose,

Les résultats sont reportés sur le tableau suivant.

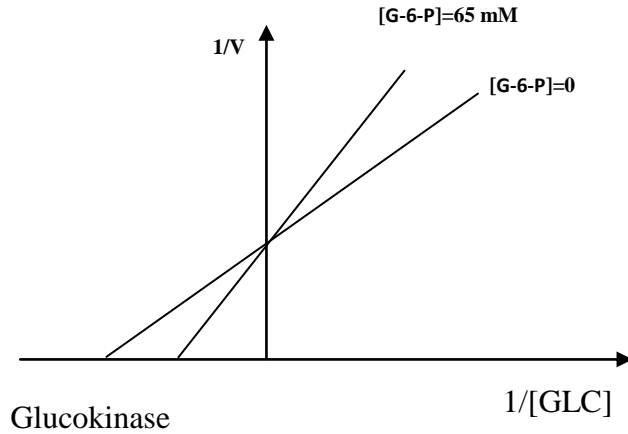
[GLC]	0,05	0,1	0,5	1	5	10	15	150	500	1500
V1	0,15	0,2	0,27	0,29	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
V2	0,01	0,01	0,03	0,06	0,25	0,4	0,5	0,91	0,97	1
V1+V2	0,15	0,20	0,30	0,35	0,55	0,70	0,80	1,21	1,27	1,30

Les vitesses initiales sont exprimées en UI par g de foie, et l'on suppose que la séparation a été effectuée sans perte d'activité.

- 1) Déduire de ce tableau les K_M et V_{max} approximatives des deux enzymes : aucun calcul, aucune construction de courbe ne sont pas nécessaires.
- 2) Sachant que, dans un extrait non purifié, on mesure l'activité phosphorylante totale $V=V1+V2$, imaginez une méthode de détermination approximative des activités (V_{max}) respectives de HK et de GK sans séparation préalable (une erreur de 10% est toléré).
- 3) Les cinétiques sont maintenant effectuées sur les deux enzymes séparées, en l'absence ou en présence de G-6-P. on obtient alors les résultats suivants, en représentation de Lineweaver-Buk :



Courbe 1



Courbe 2

Qu'en déduisez-vous ?

Exercice 3

La phosphatase alcaline catalyse des monoesters phosphoriques selon la réaction générale suivante :





Le substrat utilisé pour cette étude cinétique est le nitro-4-phénylphosphate de sodium.

La réaction est suivie en dosant spectrophotométriquement le nitro-4-phénol libéré par l'hydrolyse du substrat. La vitesse initiale de la réaction est mesurée pour des concentrations différentes en substrat à $+ 20^\circ\text{C}$ et à $\text{pH} = 9,8$.

Trois essais sont réalisés : les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau ci-dessous (vitesses initiales données en unités arbitraires (ua)) :

Substrat (mol.L^{-1})	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Essai 1 (ua)	0,178	0,278	0,416

1. Ecrire l'équation de Michaelis et Menten avec démonstration ?
2. Définir les grandeurs cinétiques K_m et V_{\max} ?
3. Donner la signification de la grandeur K_m ?
4. A partir de l'équation de Michaelis et Menten, déduire l'équation dont la représentation graphique est de type $1/V_i = f(1/[S])$.
5. A partir des valeurs expérimentales ci-dessus, tracer pour l'enzyme étudiée la courbe $1/V_i = f(1/[S])$?
6. Que deviendraient K_M et V_{\max} si l'on doublait la concentration en enzyme ?

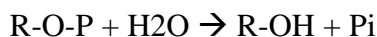
 Ecole Supérieure de Technologie Béni-Mellal		 جامعة السلطان مولاي سليمان Université Sultan Moulay Slimane
Filière : Agro-industrie	1^{ère} année cycle DUT Module: biochimie	Professeur: Khalid BOUTOIAL
Partie II : Enzymologie Série 2 des Travaux dirigés		

Exercice 1

Le lait cru contient naturellement plusieurs types d'enzymes dont la phosphatase alcaline (PAL) qui est une enzyme soluble, un traitement thermique du lait à une température de l'ordre de 72°C pendant 15-20 seconds est suffisant pour le détruire, dans les industries laitières la présence de PAL dans le lait pasteurisé c'est un indicateur de mauvaise pasteurisation.

La PAL du lait est enzyme dimérique de masse moléculaire de $1,7 \cdot 10^5$ Da, de nature glycoprotéique, elle contient 4 atomes de zinc nécessaires à son activité. L'ion Mg^{2+} est un activateur la L-cystéine et les chélateurs de métaux sont des inhibiteurs. Son pH optimal d'activation est de 10

Elle catalyse l'hydrolyse les mono-esters phosphoriques selon la réaction suivante :



La PAL du lait est purifiée selon deux étapes :

Etape 1 : le pH du lait est ajusté à 4,5 par l'ajout d'une solution tampon, puis maintenu à -4°C une heure. Il est centrifugé, le précipité obtenu est ensuite remis en solution dans l'eau distillée et on obtient la solution E1.

Etape 2 : la solution E1 est additionnée d'un même volume d'acétone, puis maintenue une nuit à -4°C. Elle est centrifugée, le précipité obtenu est dissous dans une solution tampon. Après dialyse contre l'eau distillée on obtient la solution E2.

On propose de déterminer l'activité du lait et les solutions E1 et E2, les résultats expérimentaux sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

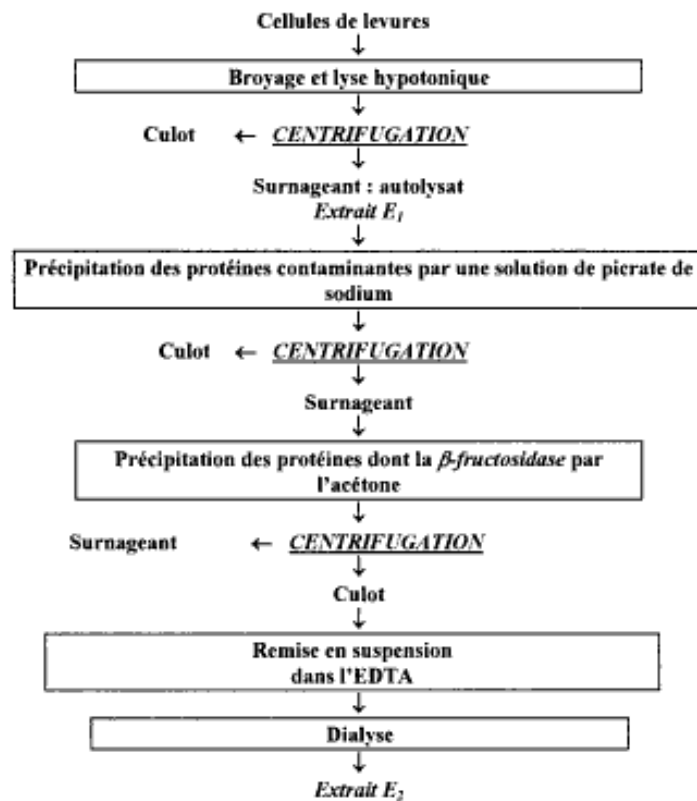
	Volume (mL)	CAC (UI/mL)	Protéines (mg/mL)
Lait	6000	405	14
Solution E1	2500	420	6
Solution E2	60	11000	12

1- Définir l'activité d'une préparation enzymatique ?

- 2- Définir la concentration d'activité catalytique (CAC) d'une préparation enzymatique ?
 - 3- Calculer l'activité totale (AT) et activité spécifique (AS) dans le lait et solutions E1 et E2 ?
 - 4- calculer pour les solutions E1 et E2 les enrichissements et les rendements de purification ?
- L'activité enzymatique du lait est la valeur de référence.

Exercice 2

L'enzyme est extraite des levures selon le protocole suivant :



On réalise sur chaque extrait (E1 et E2) un dosage de protéines. Les résultats sont illustrés dans le tableau ci-dessous

Extrait	Volume de l'extrait (mL)	Concentration massique en protéines (g/L)	Quantité de protéines totales (mg)	Concentration d'activité catalytique (UI/mL)	Activité spécifique (UI/mg)	Activité totale
E1	30,00	1,19				
E2	9,50	0,89				

1. Calculer la quantité de protéines totales de chaque extrait enzymatique ?
2. Déterminer la concentration d'activité catalytique sachant que :

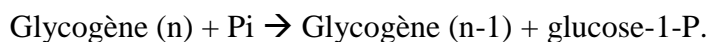
- L'équation de la droite d'étalonnage du spectrophotomètre pour le dosage du sucre inverti est : $A=0,160.q$ (A est l'absorbance et q la quantité de sucre inverti en μmol par tube).
- Pour chaque dosage le protocole suivant est utilisé :
- Dans un tube à essai introduire 1 mL d'extrait dilué (E1 au 1/50 et E2 au 1/100) et 1 mL de tampon acétate
- Placer en bain marie à 25°C pendant 5 min
- Ajouter 1mL de saccharose à 0,36 mol/L et laisser la réaction se dérouler 5 min.
- Ajouter 2 mL de réactif 3,5DNS
- Boucher les tubes avec coton et les porter 5 min au bain-marie bouillant à 100°C
- Après refroidissement ajouter 15 mL d'eau distillée et effectuer des lectures d'absorbance dans le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm contre le témoin (même protocole sans enzyme)

Extrait	Absorbance à $\lambda=530$ nm
E1	0,624
E2	0,768

3. Déterminer l'activité spécifique en UI /mg et l'activité totale en UI de chaque extrait ?
4. Calculer le rendement et l'enrichissement du protocole suivi ?

Exercice 3

La glycogène phosphorylase catalyse du glycogène en glucose-1-P selon la réaction suivante :



La fixation de Pi sur l'enzyme montre une très forte coopérativité. Le G-6-P diminue l'affinité de l'enzyme pour le glycogène alors que l'AMP l'augmente. Dans la forme T de l'enzyme, le résidu Asp₂₈₃ fait face au site actif, dans la forme R, ce résidu se retrouve éloigné, alors que le résidu Arg₅₆₉ prend sa place.

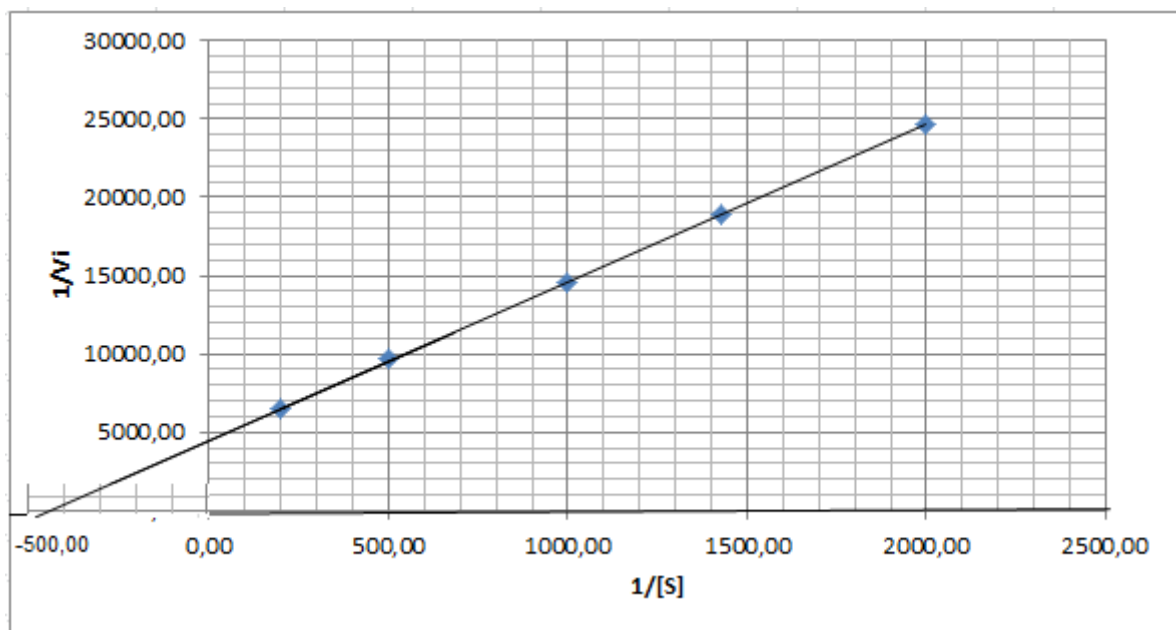
Quelle conformation (R ou T) a la plus forte affinité pour Pi ? ATP, AMP ou G-6-P ? Expliquer l'importance biologique de l'effet de ces trois derniers ligands sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Expliquer la différence d'affinité des formes R et T pour le phosphate inorganique ?

Solution de TD d'enzymologie

Exercice 1

Concentration molaire en lactose	$1/[S]$	V en moles de lactose hydrolysé par min et par mg d'enzymes	$1/V_i$
0,005	200	0,000155	6451,613
0,002	500	0,000103	9708,738
0,001	1000	0,0000685	14598,54
0,0007	1428,5714	0,000053	18867,92
0,0005	2000	0,0000406	24630,54



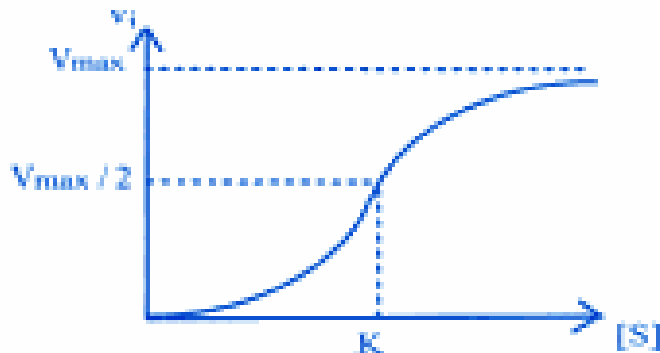
Représentation graphique de $1/V_i = f(1/[S])$

$1/V_{max}$	V_{max} (mol/min/mg d'enzyme)
4500,00	$2,22 \cdot 10^{-4}$

$-1/K_m$	K_m (mol/l)
-450	$2,22 \cdot 10^{-3}$

Exercice 2

Q1) Sachant que



Que $V_{max}/2$ correspond dans la courbe de vitesse en fonction de la concentration en substrat à la constante K_m

A partir de tableau on peut déduire que pour V_1 la $V_{max1} = 0,3 \text{ UI}$ c'est-à-dire que $V_{max1}/2 = 0,15 \text{ UI}$ correspond à $K_{m1} = 0,05 \text{ M}$

Pour $V_{max2} = 1 \text{ UI}$ et $V_{max2}/2 = 0,5 \text{ UI}$ correspond à $K_{m2} = 15 \text{ M}$.

[GLC] en M	0,05	0,1	0,5	1	5	10	15	150	500	1500
V_1 en UI	0,15	0,2	0,27	0,29	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
V_2 en UI	0,01	0,01	0,03	0,06	0,25	0,4	0,5	0,91	0,97	1
V en UI	0,15	0,20	0,30	0,35	0,55	0,70	0,80	1,21	1,27	1,30

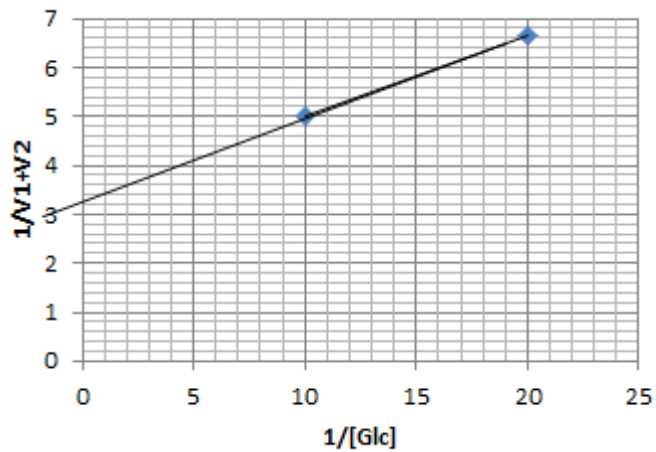
Q2)

Dans l'intervalle 1 on compare la vitesse V_1 et V_1+V_2 on trouve $V_1=V_1+V_2$

On peut conclure que juste le H_k qui catalyse la réaction et G_k sans aucune activité dans la réaction global où les deux enzymes son présents, c'est-à-dire que on peut utiliser cette intervalle pour calculer la V_{max} de H_k sans aucune séparation des enzymes

Intervalle 1		
[GLC]	0,05	0,1
V_1	0,15	0,2
V_1+V_2	0,15	0,2

On trace $1/V_1 = f(1/[Glc])$



On peut déduire à partir de la courbe que

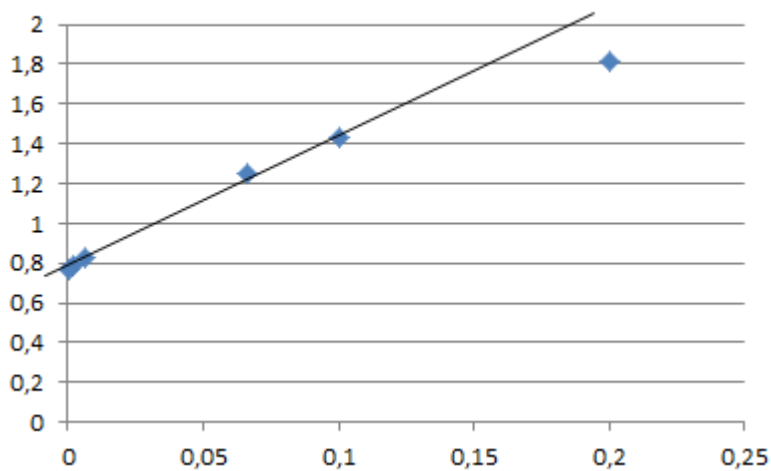
$1/V_{max1}$	$V_{max1} UI$
3,2	0,3125

Pour GK dans l'intervalle 2 on peut voir que HK a atteint sa vitesse maximale à 0,3 mais la vitesse globale de la réaction toujours e activité et V_1+V_2 augmente c'est-à-dire que le responsable de cette augmentation c'est l'enzyme GK, pour cela on peut calculer la V_{max2} sans séparation des enzymes dans l'intervalle 2

Intervalle 2						
[GLC]	5	10	15	150	500	1500
V_2	0,25	0,4	0,5	0,91	0,97	1
V_1+V_2	0,55	0,7	0,8	1,21	1,27	1,3

On trace la courbe $1/V$

$1/V_1+V_2$



On peut déduire

1/V _{max} 2	V _{max} 2
0,8	1,25

Q3) pour la première courbe les droites en présence et en absence de G6P coupes l'axe de 1/[Glc] en même point -1/K_m c'est-à-dire la molécule de G6P inhibe l'enzyme Hexokinase d'une manière non compétitive.

Dans l'enzyme Hexokinase il y a un site où la molécule de G6P se fixe pour inhiber l'enzyme inhibition non compétitive).

Dans la courbe 2 les deux droites coupent l'axe de 1/V_i en même point 1/V_{max}, c'est-à-dire que la molécule de G6P entre en compétition avec la molécule de Glucose dans le site actif de Glucokinase, ce qui inhibe l'enzyme Glucokinase d'une manière compétitive.

Les enzymes dont le K_M est très faible, s'adaptent peu car elles sont susceptibles d'être rapidement saturées. C'est le cas de l'hexokinase qui est rapidement saturée par le glucose dans le foie en période post-prandiale. La glucokinase prend alors le relais, permettant au foie d'assurer le stockage du glycogène.

Exercice 3

1) Equation de Michaelis

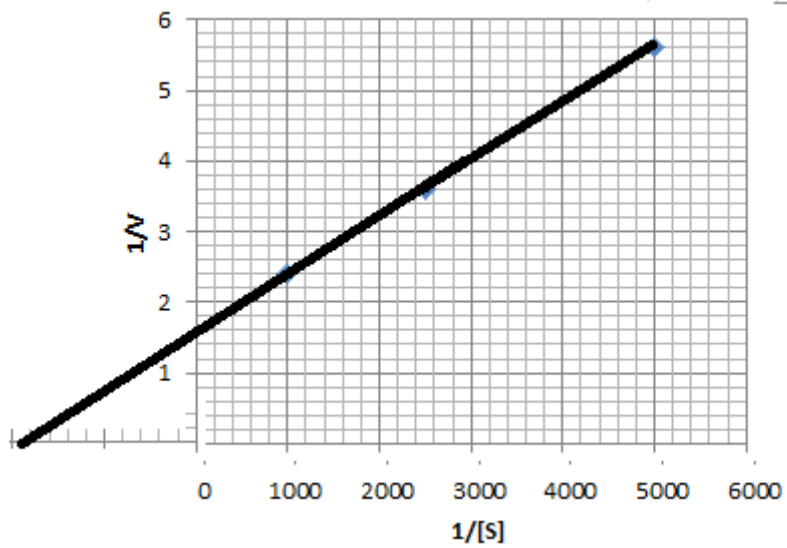
$$V_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Q2)

Q3

$$\frac{1}{V_i} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

On trace la courbe



On peut déduire $1/V_{\max} = 1,6$ c'est-à-dire que $V_{\max} = 0,625$

Et pour $-1/K_m = -1900$ c'est-à-dire que $K_m = 5,26 \cdot 10^{-4}$

Si on doublait la concentration en substrat la V_{\max} serait doublée et K_m ne change pas.

Solution de TD des enzymes allostériques

Exercice 1

Activité totale: $AT = CAC * VE$

CAC : Concentration d'activité catalytique : représente la quantité d'enzyme permettant la transformation d'une micromole de substrat par min

Pour le calcul de $AT(lait) = 405 * 6000 = 2,43.10^6$ UI

Pour $AT(E1) = 1,05.10^6$ UI

$AT(E2) = 6,6.10^5$ UI

L' AS : CAC/concentration massique

$AS(lait) = 405/14 = 28,9$ UI.mg⁻¹

$AS(E1) = 70$ UI.mg⁻¹

$AS(E2) = 917$ UI.mg⁻¹

Le rendement est donné par la formule:

Rendement : $R = (AT2/AT1). 100$

Le rendement de l'étape 1 L'activité enzymatique du lait est la valeur de référence :

$R1 = (AT(E1)/AT(lait)) * 100$

$R1 = (1,05.10^6/2,43.10^6) * 100 = 43,2\%$

L'étape 2:

$R2 = (AT(E2)/AT(lait)) * 100 = 27,2\%$

Enrichissement est défini par la relation suivante :: $E = AS2/AS1$

Pour l'enrichissement en étape 1:

$E1 = AS(E1)/AS(lait) = 70/28,9 = 2,42$

Pour l'enrichissement en étape 2 :

$E2 = AS(E2)/AS(lait) = 917/28,9 = 31,7$

Exercice 2

- Calcul de la quantité de protéine dans un extrait :

Concentration massique (protéine) = $\frac{m(\text{quantité en protéine})}{v(\text{volume de la solution protéique})}$

Donc $m=C*V$

Extrait	Volume de l'extrait (mL)	Concentration massique en protéines (g.L ⁻¹)	Quantité de protéines totales (mg)	Concentration d'activité catalytique (UI.mL ⁻¹)	Activité spécifique (UI.mg ⁻¹)	Activité totale (UI)
E ₁	30,0	1,19	35,7	39,0	32,8	1170
E ₂	9,50	0,890	8,46	96,0	108	912

2. détermination de la concentration d'activité catalytique :

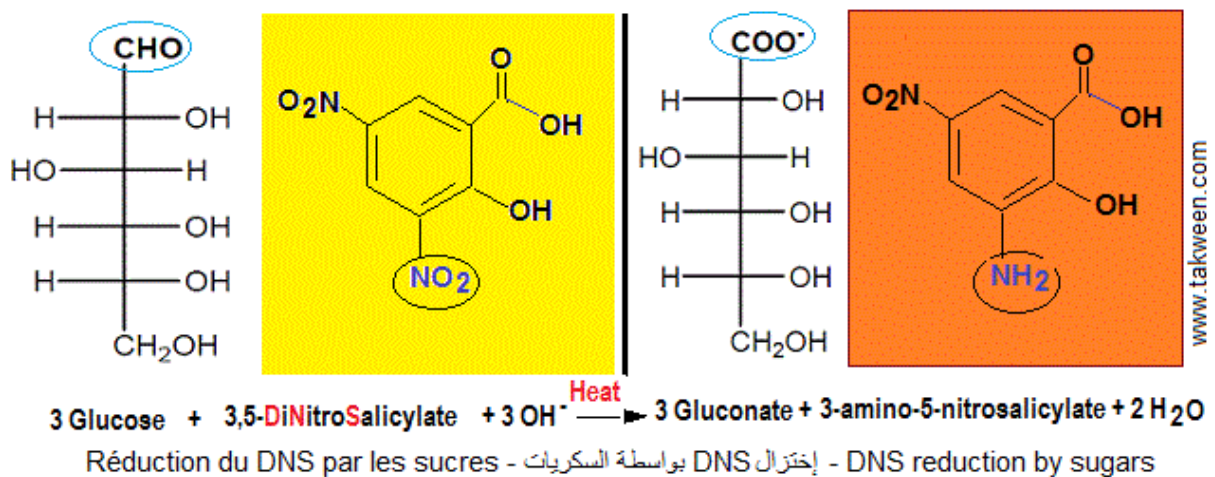
CAC : représente la quantité d'enzyme permettant la transformation d'une micromole de substrat par min

$$CAC = \frac{q}{v.t} \text{ * facteur de dilution}$$

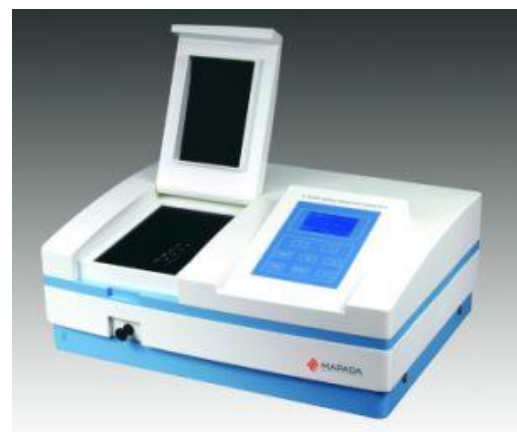
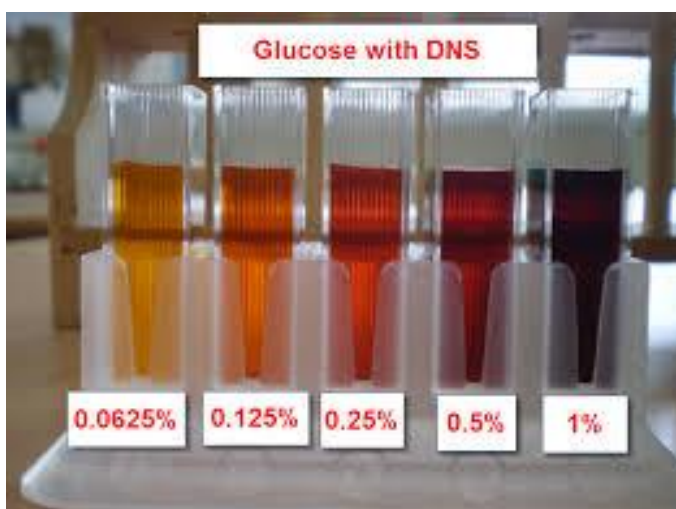
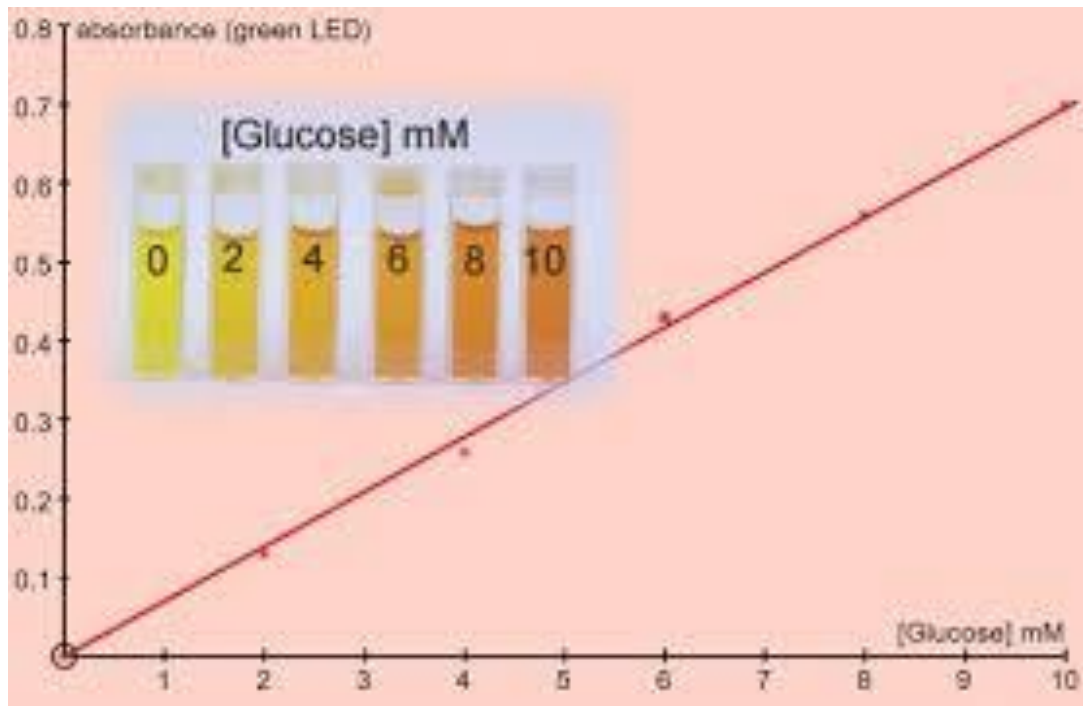
Sachant que la quantité on peut le déduire de l'équation de droite de courbe d'étalonnage

$$q = A/0,160$$

La méthode repose qu'à chaud et en milieu alcalin il ya réduction du DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) par les sucres réducteurs



La forme réduite de DNS donne une couleur rouge orange, l'intensité de la couleur c'est un indice de la concentration en sucre réducteur, cette intensité est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 530-540 nm



Spectrophotomètre

Pour le calcul du rendement et enrichissement

$$R = \frac{AT_{E_2}}{AT_{E_1}} \cdot 100 \quad R = 78 \%$$

$$E = \frac{AS_{E_2}}{AS_{E_1}} \quad E = 3,3$$

Exercice 3

Le substrat P_i se fixe préférentiellement sur la forme R, qui est la plus active par définition. D'après l'énoncé, l'AMP est un activateur de l'enzyme, il se fixe donc sur la forme R alors que le glucose-6-phosphate et l'ATP sont des inhibiteurs, qui se fixent sur la forme T.

Le glucose-6-phosphate est produit par isomérisation du glucose-1-phosphate. Il est ensuite oxydé par la voie de la glycolyse, qui produit de l'ATP. L'inhibition de la glycogène phosphorylase par le glucose-6-phosphate et l'ATP permet de ralentir la consommation de glycogène dans des conditions où les besoins de la cellule sont satisfaits (concentration élevée en ATP), ce qui permet d'économiser les stocks de glycogène. À l'inverse l'accumulation d'AMP correspond à un état cellulaire énergétiquement bas. La stimulation de la glycogène phosphorylase par l'AMP permet d'initier le processus catabolique conduisant à la régénération d'ATP.

P_i porte deux charges négatives. La présence d'un acide aminé chargé négativement tel que Asp entraîne une répulsion de P_i ; cela explique la faible affinité de la forme T de l'enzyme pour son substrat P_i . À l'inverse la présence d'une charge positive telle que celle portée par Arg dans la forme R explique la forte affinité de l'enzyme pour P_i .