

TRAVAUX DIRIGES DE BIOCHIMIE SV4

TD d'Enzymologie

Exercice 1 : Cinétique de réaction et constante de vitesse

A/- Soit la réaction de 1^{er} ordre suivante : $A \rightarrow P$

Au temps $t=0$ s $\rightarrow [A_0] = 10^{-3}$ M

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

- 1- Calculer la constante de vitesse k_1 de la réaction ?
- 2- Calculer le temps de demi-réaction (période) $T_{1/2}$?
- 3- Calculer la $[A]$ au temps $t=12$ s.

B/- Soit la réaction de 1^{er} ordre : $A \rightarrow P$ de constante de vitesse k_1 .

Dans quelles conditions la réaction de 1^{er} ordre ci-dessus peut devenir une réaction d'ordre 0. Faire la démonstration nécessaire et donner l'expression de k_0 en fonction de k_1 . Donner ensuite les dimensions de la nouvelle constante k_0 et faire une représentation schématique de V_0 en fonction du temps.

Exercice 2 : Soit la réaction de 2^{ème} ordre suivante : $A + B \rightarrow P$

Au temps $t=0$: $[A_0] = 1,2 \cdot 10^{-3}$ M ; $[B_0] = 10^{-3}$ M ;

Au temps $t=5$ s : $[A] = 9,85 \cdot 10^{-4}$ M ; $[B] = 7,85 \cdot 10^{-4}$ M.

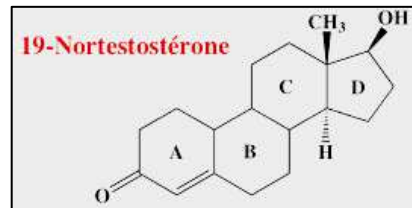
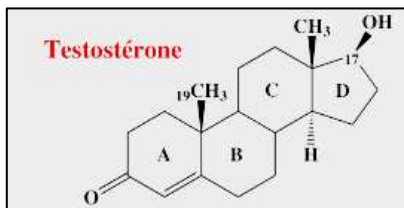
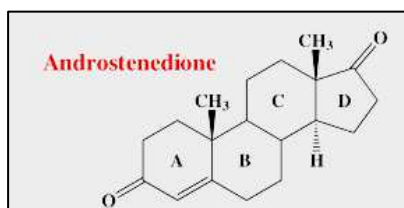
- 1- Calculer la constante de vitesse de la réaction k_2 .
- 2- Calculer la $[A]$ et de $[B]$ au temps $t=10$ s.

Questions :

- 1- Définir l'unité internationale d'Enzyme ?
- 2- L'urée est le substrat de l'uréase. Sachant que l'urée est un agent dénaturant des protéines (perturbation des liaisons hydrogène), comment expliquer que l'urée n'altère pas la fonction enzymatique de l'uréase ?
- 3- Comment vous pouvez exploiter cette propriété pour l'étude de l'activité de l'uréase ?

Exercice 3 : Cinétique enzymatique et model de Michaelis :

La cétostéroïde-isomérase catalyse l'isomérisation de différents $\Delta 5$ -3-cétostéroïdes pour former des $\Delta 4$ -3-cétostéroïdes conjugués tels que la $\Delta 4$ -androstène-3,17-dione ou la testostérone.



On veut étudier la réaction catalysée par cette enzyme (E) sur la $\Delta 5$ -androstène-3,17-dione, en absence et en présence d'un inhibiteur (I) : la 19-nortestostérone. On suit la réaction enzymatique en mesurant l'absorbance à $\lambda = 248$ nm et on obtient les résultats présentés dans le tableau ci-dessous.

$[S]_0$ (mM)	V_i (U.A.min ⁻¹) / $[I] = 0$	V_i (U.A.min ⁻¹) / $[I] = 5.5 \mu\text{M}$
0.083	0.08	0.051
0.122	0.11	0.072
0.195	0.15	0.106
0.238	0.17	0.122
0.340	0.20	0.150
0.580	0.26	0.200
0.870	0.29	0.240
1.170	0.30	0.270

Données : $[E]_0 = 7.3$ pM ; $\epsilon_M^{\text{produit}} = 17000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; U.A. = unité d'absorbance

Est-on en condition de substrat saturant ?

2. Déterminez V_{\max} , K_M et k_{cat} (en s^{-1}) par la représentation des doubles inverses.

3. Déterminez les paramètres cinétiques V_{\max}^{app} et K_M^{app} en présence de l'inhibiteur. Calculez la constante K_I . De quel type d'inhibition s'agit-il ?

4. Que suit-on à $\lambda = 248 \text{ nm}$?

Exercice 4 : Catalyse enzymatique :

La pénicilline est hydrolysée (donc inactivée) par une pénicillinase, une enzyme de masse molaire 29600, présente dans certaines Bactéries résistantes telle que *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré).

On mesure la quantité de pénicilline hydrolysée par minute, en fonction de la concentration en pénicilline. Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau suivant :

Concentration en Pénicilline en M	$(1/S) \times 10^6$	Quantité de Pénicilline hydrolysée en moles/mn		$(1/V) \times 10^9$
$0,1 \cdot 10^{-5}$	1	$0,11 \cdot 10^{-9}$		9.09
$0,3 \cdot 10^{-5}$	0.33	$0,25 \cdot 10^{-9}$		4.00
$0,5 \cdot 10^{-5}$	0.20	$0,34 \cdot 10^{-9}$		2.94
$1,0 \cdot 10^{-5}$	0.10	$0,45 \cdot 10^{-9}$		2.22
$3,0 \cdot 10^{-5}$	0.033	$0,58 \cdot 10^{-9}$		1.72
$5,0 \cdot 10^{-5}$	0.02	$0,61 \cdot 10^{-9}$		1.64

On admettra que la concentration de la pénicilline n'est pas affectée par l'expérience.

- 1- A partir des données du tableau, représenter $(1/V) = f(1/[S])$, V étant la vitesse de la réaction et $[S]$ la concentration en substrat.
- 2- La pénicillinase est-elle conforme au modèle de Michaelis-Menten ? Si oui, quelle est la valeur de la vitesse maximale V_{\max} ?
- 3- Quelle est la valeur de K_M (constante de Michaelis) ? Donner une conclusion ?

Exercice 5 : On a étudié la vitesse de la réaction catalysée par la Lactate déshydrogénase hépatique, en fonction de la concentration de Lactate, en présence ou en absence d'Oxalate ($\text{OOC}-\text{COO}^-$).

La vitesse initiale de la réaction V_i a été exprimée en mmoles de pyruvate libéré par litre et par minute. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Lactates en mmoles/L	V_i (mmoles/L/mn)	
	En absence d'oxalates	avec présence d'oxalates
2,5	0,0166	0,0100
3,3	0,0200	0,0125
5,0	0,0250	0,0166
10	0,0333	0,0250

- a- Calculer la V_{\max} et la constante K_M de la réaction en absence d'oxalate ?
- b- Calculer V_{\max} et K_M en présence d'oxalate ?
- c- Quel type d'effecteur l'Oxalate représente-t-il pour la Lactate Déshydrogénase ? Justifier ?

Exercice 6 :

La lactate déshydrogénase catalyse la réduction réversible du pyruvate en lactate : $\text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{lactate} + \text{NAD}^+$. Les vitesses initiales de la réaction sont déterminées pour différentes concentrations $[S]_0$ de pyruvate. La concentration du NADH est constante et égale à $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et $K_M^{\text{NADH}} = 5,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

On suit la disparition du NADH à $\lambda = 340 \text{ nm}$ en fonction du temps.

$[S]_0$ (mM)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1	2	3	4	5	9
V_i (U.A.min ⁻¹)	0,075	0,125	0,157	0,180	0,200	0,212	0,232	0,250	0,270	0,270	0,250	0,240	0,190

1. Tracez la courbe de saturation et commentez l'allure.
2. Déterminez V_{\max} et K_M par la représentation des doubles inverses.

Données : $\epsilon_{\text{NADH}}^{\text{NADH}} = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; U.A. = unité d'absorbance

__***

A suivre...