

TRAVAUX DIRIGES DE BIOCHIMIE SV4

CORRIGE TD d'Enzymologie – Partie 2

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 ?

Réponses :

1-L'Unité Internationale d'enzyme : ou unité internationale d'activité enzymatique c'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute ($\mu\text{mole}/\text{min}$).

- UI = quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat/mn →

1 UI = 16,66 nanokatal.

- Le Katal = quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une mole de substrat par seconde. On utilise en général en Médecine le microkatal ou le nanokatal.
- UI = Quantité d'enzyme qui catalyse 10^{-6} mole S/60 s = quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 16.66×10^{-9} moles de Substrat/s = 16,66 nanokatal.

2- L'urée est un agent dénaturant des Protéines (à fortes concentration 6 à 8 M) : perturbation des liaisons hydrogènes → Perte de la conformation spatiale de la Protéine → diminution de la solubilité → Précipitation des protéines.

En présence de l'uréase, l'urée est hydrolysée en milieu aqueux en ammoniacque et en dioxyde de carbone. Elle est transformée à grande vitesse. En présence d'urée, l'uréase sera en principe toujours active car l'urée n'aura pas le temps de manifester son pouvoir dénaturant sur l'uréase et sera transformée rapidement par l'uréase (Enzyme spécifique de l'urée). A fortes concentrations en urée, l'uréase ne sera pas dénaturée mais son activité uréase peut-être inhibée par un excès de substrat où plusieurs molécules d'urée entrent en compétition sur le site actif d'une même enzyme d'où un blocage de son activité

3- Pour l'étude de l'activité de l'uréase, on est obligé de passer par l'étape d'extraction et de purification de l'uréase. L'extraction se fait par un tampon d'extraction (solution tampon PBS pH=7, en présence de NaCl 0.9 %) : on extrait les protéines totales y compris l'uréase. On peut dénaturer les autres protéines en ajoutant une quantité importante d'urée (par exemple 4M) tandis que l'uréase peut résister à la dénaturation. On peut jouer aussi sur le pHi de sorte à faire précipiter les autres protéines autres que l'uréase (pHi de l'uréase ≈ 5.1). Il est aussi possible de recristalliser l'uréase.

Exercice 3 : Cinétique enzymatique et model de Michaelis :

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

→ On suit la réaction enzymatique en mesurant l'absorbance à $\lambda = 248 \text{ nm}$ 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 μM
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 ; ε_{M^{produit}} = 17000 M⁻¹.cm⁻¹; U.A. = unité d'absorbance

La lecture des DO à λ=248 nm par spectrophotométrie permet de réaliser un suivi direct de la formation du produit en fonction du temps donc un suivi de l'évolution de la réaction enzymatique dans le temps.

Dans la cuve du spectrophotomètre, il faut mettre le tampon, l'enzyme et au temps t=0s on ajoute le substrat. Les données du tableau indiquent des valeurs de Vi en Unités de DO/min. On remarque que plus la concentration en substrat augment plus la Vi augmente ce qui signifie que la longueur d'onde λ=248 nm correspond à l'absorbance du produit la testostérone. On suit donc la formation du produit.

➔ On est en conditions saturante de l'enzyme puisque les [S] sont de l'ordre de mM et la [E]₀ = 7.3 pM soit 10⁻¹² M : l'ordre de grandeur du substrat par-rapport à l'enzyme est de 10⁹.

2. Déterminez les paramètres cinétiques V_{max}, K_M et k_{cat} (s⁻¹) par la représentation des doubles inverses?

➔ Avant de déterminer les paramètres cinétiques, il faut d'abord vérifier est ce que cette enzyme : La cétostéroïde-isomérase respecte la Loi de Michaelis ou non. Il faut d'abord convertir les Vi en unités de concentrations en M/min. Cette conversion est possible en utilisant le coefficient d'absorption molaire ε_M.

➔Exemple de calcul :

On considère la première valeur de Vi = 0,08 UA/min obtenue pour une [S] = 0,083 mM = 0,083 . 10⁻³ M D'après la loi de Beer-Lambert = DO = ε x l x M (l : trajet optique = 1 cm et M concentration molaire).

⇒ M = DO / (ε x l) soit pour la vitesse: Vi= DO/ ε = (0,08/17000) M/min = 4,7059 . 10⁻⁶ M/min.

Pour la représentation en double inverse, il faut calculer 1/[S] et 1/Vi, ce qui signifie qu'il faut calculer (en plus de 1/[S]) la valeur correspondante de 1/Vi = ε/DO= 17000/ DO en absence et en présence d'inhibiteur.

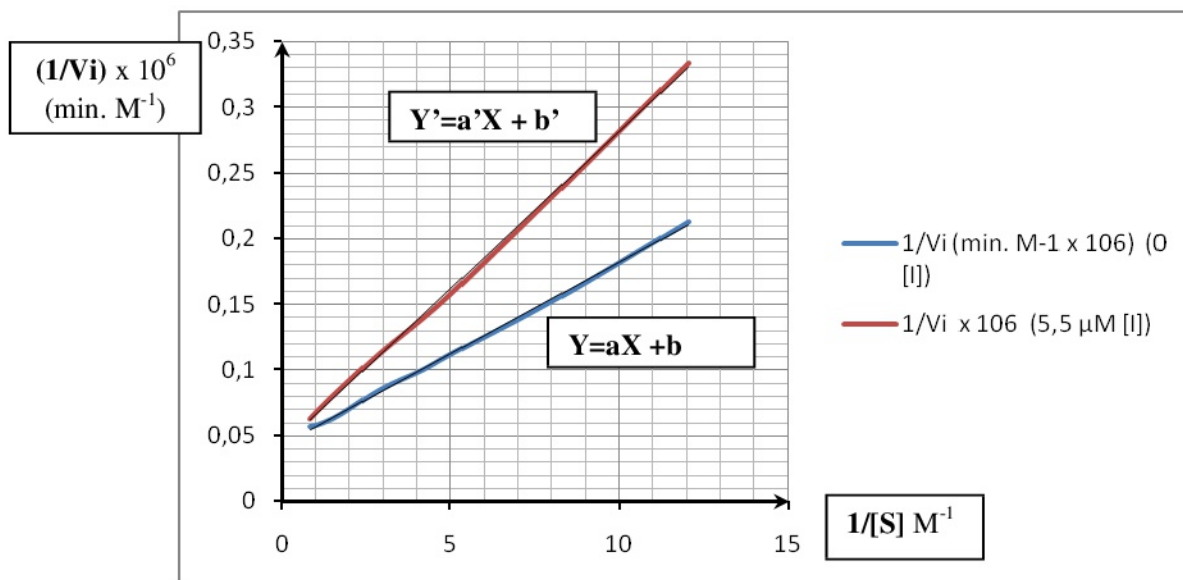
Les valeurs calculées sont données en tableau ci-dessous :

[S] ₀ (mM)	1/[S] ₀ x 10 ⁻³ M ⁻¹	En absence d'inhibiteur [I] = 0		En présence d'inhibiteur [I] = 5.5 μM	
		V _i (U.A.min ⁻¹)	1/Vi (min /M)	V _i (U.A.min ⁻¹)	1/Vi (M/min)
0.083	12048,2	0.08	212500,00	0.051	333333,333
0.122	8196,72	0.11	154545,4545	0.072	236111,111
0.195	5128,20	0.15	113333,333	0.106	160377,36
0.238	4201,68	0.17	100000,00	0.122	139344,2623
0.340	2941,18	0.20	85000,00	0.150	113333,33
0.580	1724,14	0.26	65384,6154	0.200	85000,00
0.870	1149,425	0.29	58620,69	0.240	70833,333
1.170	854,70	0.30	56666,666	0.270	62962,963

Pour faciliter la représentation graphique de $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$, on peut mettre toutes les valeurs de $1/V_i$ sous forme de $(1/V_i) \times 10^6$ ce qui donne les valeurs suivantes :

$[S]_0$ (mM)	$1/[S]_0$ M^{-1}	En absence d'inhibiteur $[I] = 0$		En présence d'inhibiteur $[I] = 5.5 \mu M$	
		V_i (U.A.min $^{-1}$)	$1/V_i$ (min /M) $\times 10^6$	V_i (U.A.min $^{-1}$)	$1/V_i$ (min/M) $\times 10^6$
0.083	12,0482	0,08	0,21250000	0,051	0,333333
0.122	8,19672	0,11	0,1545454545	0,072	0,2361111
0.195	5,12820	0,15	0,1133333333	0,106	0,16037736
0.238	4,20168	0,17	0,10000000	0,122	0,1393442623
0.340	2,94118	0,20	0,08500000	0,150	0,113333
0.580	1,72414	0,26	0,0653846154	0,200	0,08500000
0.870	1,149425	0,29	0,05862069	0,240	0,070833333
1.170	0,85470	0,30	0,056666666	0,270	0,062962963

Ce qui donne en représentation graphique en absence et en présence d'inhibiteur :



D'après cette représentation, il paraît clair que cette enzyme respecte la loi de Michaelis-Menten. On doit vérifier aussi, si les deux droites ont la même ordonnée à l'origine b .

En absence d'inhibiteur :

On peut donc déterminer les paramètres cinétiques K_m , V_{max} et K_{cat} : (graphiquement ou par calcul mathématique)

La transformation mathématique de l'expression de la Vitesse initiale d'après Michaelis Menten donne :

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \Rightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Cette formule est de la forme $Y = aX + b$ avec a = pente de la droite = (K_m/V_{max}) et b l'ordonnée à l'origine ($1/V_{max}$)

⇒ Calcul de la pente : $a = K_m/V_{max} = (0,056 - 0,2125) \times 10^6 / (0,8547 - 12,0482) = 0,014 \times 10^6 \text{ min}$

⇒ Calcul de l'ordonnée à l'origine $b = 1/V_{max}$: on prend les coordonnées d'un point de la droite (0,8547 ; 0,0566)

A.N. : $\Rightarrow 0,0566 \cdot 10^6 = (0,014 \cdot 10^6 \times 0,8547) + b \Rightarrow b = (1/V_{max}) = 0,0446342 \cdot 10^6 \text{ min. } M^{-1}$

Ce qui signifie que $V_{\max} = (1/b) = 22,4043 \times 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$.

- **Détermination de K_M directement** à partir de la valeur de la pente de la droite :
- $a = (K_M/V_{\max}) \rightarrow K_M = a \times V_{\max}$
A.N. : $K_M = 0,014 \times 10^6 \times 22,4043 \times 10^{-6} = 0,31366 \text{ M}$
- détermination de K_{cat} : d'après le postulat de Michaelis-menten : $V_2 = K_{\text{cat}} \cdot [\text{ES}]$
d'où : $V_{\max} = K_{\text{cat}} \times [\text{E}_T] \rightarrow K_{\text{cat}} = (V_{\max}/[\text{E}_T]) = 22,4043 \cdot 10^{-6} / 7,3 \cdot 10^{-12} = 3,0690822 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1}$

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 ?

En présence de $5,5 \mu\text{M}$ d'inhibiteur :

Pour les paramètres cinétiques V_{\max}^{app} et K_M^{app} , on va suivre le même raisonnement en utilisant la 2^{ème} droite obtenue en présence de $5,5 \mu\text{M}$ d'inhibiteur.

On a $Y' = a'x + b' \rightarrow$ La pente $a' = (K'_M/V'_{\max}) = (0,063 - 0,333) \cdot 10^6 / (0,85470 - 12,0842)$
 $a' = 24043,813 \text{ min} = 0,0240438 \cdot 10^6 \text{ min}$

L'ordonnée à l'origine $b' = (1/V'_{\max}) = (0,062962963 - 0,02055023586) = 0,042412727 \cdot 10^6 \text{ min} \cdot \text{M}^{-1}$

D'où $V'_{\max} = (1/b') = 23,57783 \times 10^{-6} \text{ M/min} \approx V_{\max}$ (valeur en absence d'inhibiteur).

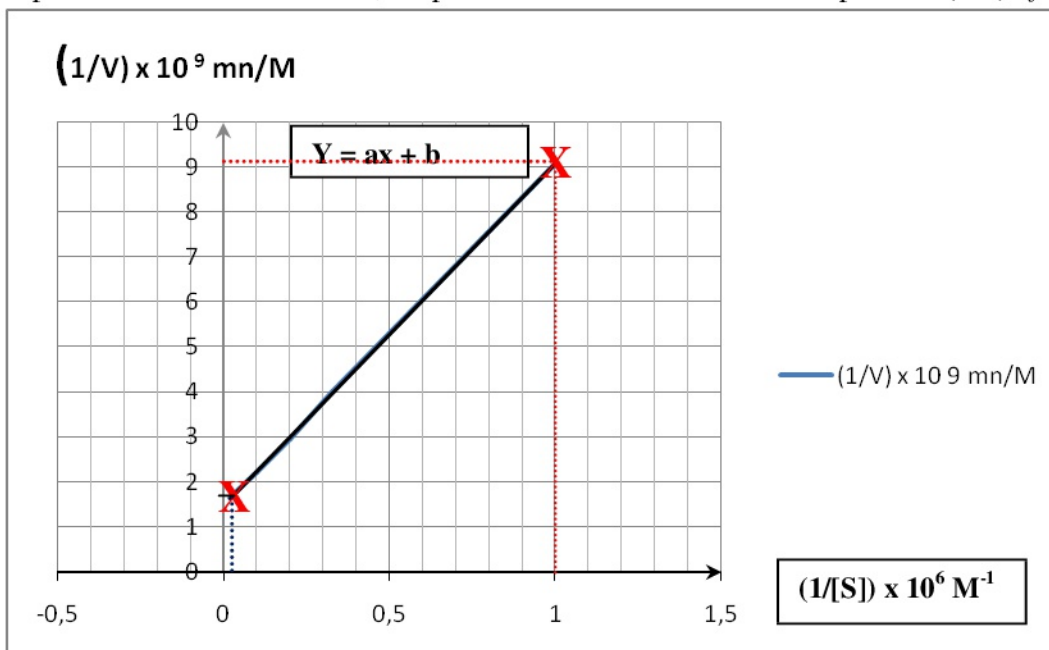
$K_M^{\text{app}} = K'_M = a' \times V'_{\max} = 0,0240438 \times 10^6 \times 23,57783 \times 10^{-6} = 0,5669 \text{ M} > K_M$

Il s'agit dans ce cas **d'un inhibiteur compétitif** car K_M change et V_{\max} reste constante ;

$K'_M = K_M (1 + [I]/K_I) \rightarrow K_I = [I]/((K'_M/K_M) - 1) = 5,5 / (0,80737) = 6,81223 \mu\text{M}$.

Exercice 4 : Catalyse enzymatique et étude de l'activité de la Pénicilline :

1- A partir des données du tableau, et après vérification des données on représente $(1/V) = f(1/[S])$:



2- La représentation graphique $1/V = f(1/[S])$ donne une droite de la forme $Y = ax + b \rightarrow$ on peut en conclure que la pénicilline est conforme au modèle de Michaelis – Menten.

3- **Détermination des paramètres cinétiques V_{\max} et K_M :**

D'après l'équation transformée de Michaelis-Menten, la pente $a = (K_M/V_{\max}) = (9,09 - 1,64) \cdot 10^9 / (1 - 0,02) \cdot 10^6 = 7,602 \cdot 10^3 \text{ mn}$.

$b = (1/V_{\max}) = (9,09 \cdot 10^9) - (7,602 \cdot 10^3 \cdot 10^6) = 1,488 \cdot 10^9 \text{ min/M} \rightarrow V_{\max} = (1/b) = 0,672 \cdot 10^{-9} (\text{M/min}) \rightarrow K_M = a \cdot V_{\max} = 5,109 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

\Rightarrow **Conclusion :** Cette Pénicilline présente une très grande affinité pour la pénicilline ($K_M < 10^{-4} \text{ M}$).