

Travaux dirigés : Enzymologie.

Exercice 1 :

1. Citer les 3 types d'AA constituants le site actif d'une enzyme, préciser le rôle de chaque type.
 - **Acides aminés auxiliaires** : responsables de l'orientation du substrat et de la flexibilité de la structure.
 - **Acides aminés de contact** : sont directement impliqués dans la catalyse enzymatique
 - **Acides aminés contributeurs** : sont impliqués dans le maintien de la conformation particulière du site actif.
2. Enumérer les différences qui existent entre les coenzymes libres et coenzymes liés ?

Coenzymes libres	Coenzymes liés
<ul style="list-style-type: none">▪ Forment de faibles liaisons avec l'enzyme.▪ Interviennent dans la réaction de manière stœchiométrique.▪ Leur concentration est de la même grandeur que celle du substrat.▪ Se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.	<ul style="list-style-type: none">▪ Forment de fortes liaisons avec l'enzyme.▪ Interviennent dans la réaction de manière catalytique.▪ Leur concentration est de la même grandeur que celle de l'enzyme.▪ Ne se dissocient pas de l'enzyme.

3. Quelle est la signification de chacune des constantes suivantes : Vmax, Km, Kcat ?
 - **La vitesse maximale (Vmax)**: est la vitesse initiale maximale obtenue en excès de substrat
 - **Constante de Michaëlis (Km)**: a 2 significations :
 - **La concentration en S pour laquelle la moitié des sites actifs sont occupés.** $[S] \rightarrow V_i = V_{max}/2$
 - **L'affinité de l'enzyme pour son substrat**
 - Constante catalytique (Kcat): ou « TurnerOver Number=TON » est comme étant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps lorsque l'enzyme est saturée. $K_{cat} = V_{max} / [E]_T$ (exprimée en S-1), elle renseigne sur l'efficacité catalytique de l'enzyme.

4. Citer les conditions nécessaires pour la mesure de l'activité enzymatique.

- Concentration saturante en substrat (50 à 100*Km).
- pH optimal de l'enzyme (milieu tamponné).
- Température optimale de l'enzyme (milieu thermostaté, 25°-30°-37°).
- Présence d'activateurs et absence d'inhibiteurs.

But: se rapprocher le plus possible de Vmax

5. Définir les unités enzymatiques : UI et Katal. Comment se fait la conversion entre les 2 unités ?

- **L'unité internationale (UI)** : quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat par minute (micromole/min).

- **Le katal (Kat)** : quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une mole de substrat par seconde (mole/S).

La conversion entre les deux unités : **1 kat = 6×10^7 U.**

Exercice 2 :

Répondre par vrai ou faux, justifier.

1. Les enzymes sont des biocatalyseurs qui augmentent la vitesse des réactions chimiques en augmentant l'énergie d'activation de ces dernières. **FAUX**

Les enzymes sont des biocatalyseurs qui augmentent la vitesse des réactions chimiques en abaissant l'énergie d'activation de ces dernières

2. Le site de fixation et reconnaissance du substrat est constitué d'AA de contact (**Acides aminés auxiliaires**). **FAUX**

3. Les AA constituant le site catalytique sont impliqués dans la catalyse enzymatique par leurs chaînes ioniques et réactives. **VRAI**

4. Une enzyme oligomérique est constituée de plusieurs sous-unités identiques et possède une structure tertiaire. **FAUX** (**possède une structure quaternaire**)

5. Un complexe multienzymatique est formé de plusieurs sous-unités ayant des activités catalytiques différentes. **Vrai**

6. Les izoenzymes sont des enzymes catalysant la même réaction chimique mais qui diffèrent par leurs structures, propriétés physicochimiques et leur localisation tissulaire. **VRAI**

7. Les transférases sont des enzymes qui transfèrent un groupement chimique à l'intérieur d'une même molécule. **FAUX** (**Catalysent les transferts de groupements d'une molécule à une autre.**)

8. La vitesse initiale est la vitesse avec laquelle commence une réaction enzymatique et elle se mesure durant la phase pré-stationnaire. **FAUX** (**la vitesse initiale est la plus grande de toutes les vitesses qu'on peut mesurer en fonction des phases de la réaction, elle se mesure durant la phase stationnaire.**)

9. Une enzyme ayant une activité catalytique très efficace possède : **Km ↑↑ et Kcat ↑↑.** **FAUX** (**Kcat ↑↑ et un Km ↓↓**)

10. Chaque enzyme possède une température et pH optimales au niveau desquels l'activité enzymatique est maximale. **VRAI**

11. Dans les réactions de type ping-pong les 2 substrats peuvent se lier transitoirement en même temps sur l'enzyme. FAUX (les 2 substrats ne peuvent jamais se trouver en même temps sur l'E dans les réactions de type pind-pong.)
12. Une enzyme allostérique est une enzyme oligomérique possédant une structure quaternaire. VRAI
13. Dans le modèle séquentiel de Koshland la transition allostérique se fait pour toutes les sous unités en même temps. FAUX (les sous unités font la transition allostérique individuellement dans le modèle de Koshland)
14. La cinétique d'une enzyme allostérique obéit à une équation de Michaelis-Menten généralisée. FAUX (Les enzymes allostériques ne suivent pas une cinétique michaelinne (pas d'hyperbole)).
15. L'effet hétérotrope est la modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat suite à la fixation de ce dernier sur le site allostérique. FAUX (la modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat suite à la fixation de ce dernier sur le site allostérique est l'effet homotrope)

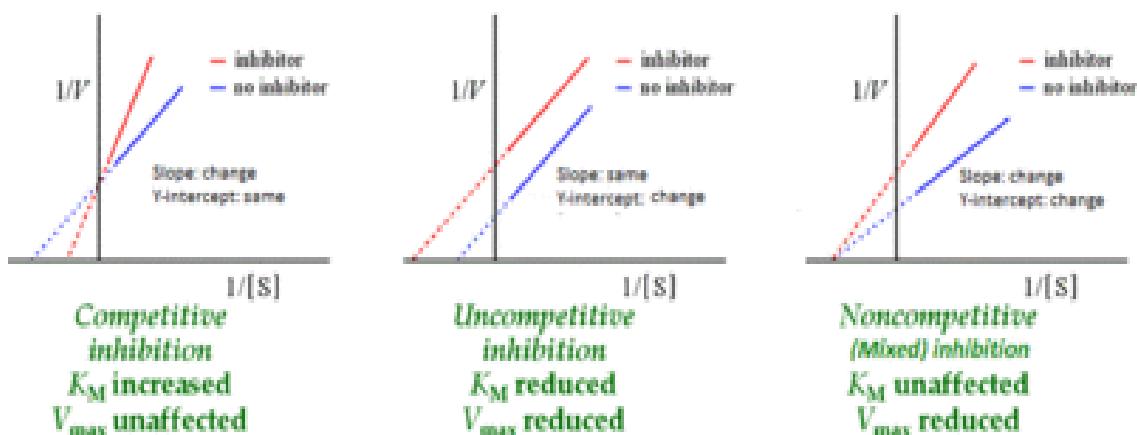
Exercice 3 :

Compléter le tableau suivant :

	Inhibiteur compétitif	Inhibiteur non compétitif	Inhibiteur incompétitif
Analogie structurale avec le substrat	OUI	NON	NON
Site de fixation sur l'enzyme	le site catalytique lui-même	un site différent du site catalytique	se fixe sur le complexe enzyme substrat
Affinité pour le substrat	Diminue l'affinité de l'enzyme pour son substrat	N'influence pas l'affinité de l'enzyme pour le substrat	Augmente l'affinité de l'enzyme pour le substrat
Km	Augmente	Ne change pas	Diminue
Vmax	Ne change pas	Diminue	Diminue

Représentation de Lineweaver – Burk des 3 types d'inhibiteurs (voir image 1 et 2)

Lineweaver-Burk plots for enzyme inhibition



	► Competitive	■ Non-competitive	● Incompetitive
graphiques	 V_e (Y-axis), $[S]$, mM (X-axis)	 V_e (Y-axis), $[S]$, mM (X-axis)	 V_e (Y-axis), $[S]$, mM (X-axis)
Double Réciproque	 $1/V_e$ (Y-axis), $1/[S]$ (X-axis)	 $1/V_e$ (Y-axis), $1/[S]$ (X-axis)	 $1/V_e$ (Y-axis), $1/[S]$ (X-axis)