

EXERCICES D'ENZYMOLOGIE

Exercice n°1 :

Une enzyme catalyse la réaction : $S \rightarrow P$.

Les vitesses initiales ont été déterminées pour chacune des concentrations initiales en substrat suivantes :

Q1: Vérifier que la cinétique est michaelienne.

Si la cinétique est michaelienne, les données doivent vérifier la relation de Michaelis-Menten.

Q2: Si $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5} M$, quelle est la vitesse initiale?

Même question pour $[S] = 5 \cdot 10^{-5} M$ et $[S] = 0,02 M$.

Q3: Si $[S] = 1 \cdot 10^{-2} M$, quelle est la vitesse initiale si la quantité d' enzyme est doublée?

Q4: Si $[S] = 0,04 M$, quelle est la concentration en P après 3 min?

S (mol / l)	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$	6,25.
Vi (nmol / l / min)	75	74,9	60	56,25	15

Exercice n°2 :

L'activité d'une enzyme est testée après deux étapes de purification successives :

étape 1 : 1,2 g de protéine sont récupérés dans 50 ml (extrait 1).

étape 2 : 0,36 g de protéine sont récupérés dans 12 ml (extrait 2).

La dilution de 20 µmicro de chaque extrait dans 1 ml de milieu réactionnel se traduit par la formation de 1,6 micromole (extrait 1) et 5,9 micromoles (extrait 2) de produit par minute.

Q1: Quel est le rendement de la purification ?

Q2: L'activité de l' enzyme est testée sur les mêmes extraits obtenus après purification:

étape 1 : 1,2 g de protéine sont récupérés dans 50 ml (extrait 1).

étape 2 : 0,36 g de protéine sont récupérés dans 12 ml (extrait 2).

La dilution de 20 microl de chaque extrait dans 1 ml de milieu réactionnel se traduit par la formation de 1,6 micromole (extrait 1) et 5,9 micromoles (extrait 2) de produit par minute.

Quel est l'enrichissement (=degré de purification) de l' enzyme au cours de la purification ?

Exercice n°3 :

Un enzyme purifié de masse molaire 800 000 g/mol, catalyse la transformation de S (substrat) en P (produit) avec un $K_m = 10^{-5} M$. La solution d' enzyme pur, à la concentration de 150 mg/ml, est capable, si la concentration en S est de $1 \times 10^{-2} M$, de catalyser la réaction à une vitesse de $3 \times 10^{-5} M/min$.

Q1: Donnez la définition de l'activité molaire et son unité.

Est-il possible de calculer l'activité molaire de l' enzyme décrit ici ? Si oui, justifiez votre réponse et calculez-la.

Q2: Déterminez graphiquement (avec la représentation la plus précise) la vitesse (V)

si $[S] = 5 \times 10^{-5} M$.

Exercice 4 :

Un étudiant en biochimie arrive en retard à un examen pratique dont voici l'énoncé :

Soit E un enzyme qui transforme S (substrat incolore) en P (produit jaune). Vous réaliserez à partir d'une solution de S à 1M les dilutions suivantes auxquelles vous ajouterez E et incuberez 10 minutes à 37°C. Le volume final est de 1 ml. Vous prendrez ensuite la D0 410 nm.

$[S] : 10^{-3} M ; 2 \times 10^{-3} M ; 3 \times 10^{-3} M ; 5 \times 10^{-3} M ; 10^{-2} M ; 2 \times 10^{-2} M ; 3 \times 10^{-2} M ; 10^{-1} M ; 2 \times 10^{-1} M$ et $3 \times 10^{-1} M$.

Vous déterminerez graphiquement K_m (en M) et V_{max} (en mmoles/min) de l' enzyme pour S.

On vous rappelle l'équation de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \text{ et } e = 5000 \text{ L/mol/cm.}$$

N'ayant plus assez de temps notre étudiant décide de résoudre son problème différemment et ne fait les mesures que pour 2 valeurs de $[S]$:

D0 = 0,25 pour $[S] = 5 \times 10^{-3} M$

D0 = 0,35 pour $[S] = 10^{-2} M$

Q1: Comment passe-t-on de la D0 à 410 nm à la vitesse en mmoles/min ?

Calculer la vitesse pour les deux valeurs de D0 données.

Q2: Quel est la démarche de l'étudiant, déterminez K_m et V_{max} et recherchez les risques.

Exercice n°1 :

Une enzyme catalyse la réaction : $S \rightarrow P$.

Les vitesses initiales ont été déterminées pour chacune des concentrations initiales en substrat suivantes :

S (mol / l)	$1. 10^{-2}$	$1. 10^{-3}$	$1. 10^{-4}$	$7,5. 10^{-5}$	6,25.
Vi (nmol / l / min)	75	74,9	60	56,25	15

Question 1:

Vérifier que la cinétique est michaelienne.

Si la cinétique est michaelienne, les données doivent vérifier la relation de Michaelis-Menten.

Aide 1 :

Un moyen de le constater est de tracer $1 / V_i$ en fonction de $1 / [S]$.

Si la cinétique est michaelienne, on doit obtenir une droite.

Réponse

La cinétique est michaelienne, avec $V_{\max}=75$ nmol/L /min et $K_m=2,5 \cdot 10^{-5}M$.

Question 2:

Si $[S] = 2,5 \cdot 10^{-5}M$, quelle est la vitesse initiale?

Même question pour $[S] = 5 \cdot 10^{-5}M$ et $[S] = 0,02 M$.

Aide 1 :

La cinétique est michaelienne, avec $V_{\max}=75$ nmol / l / min et $K_m=2,5 \cdot 10^{-5}M$.

Pour répondre à la question, il faut comparer $[S]$ et K_m et/ou remplacer $[S]$ dans la relation de Michaelis-Menten.

Réponse :

Si $[S]=K_m$ alors $V_i = (V_{\max}) / 2 = 37,5$ nmol/L/min.

Si $[S] = 2 K_m$ alors $V_i = (2 / 3) \cdot V_{\max}$.

$V_{\max}=75$ nmol/L/min.

Si $[S] = 0,02 M$ alors $[S]$ est très supérieure à K_m donc $V_i=V_{\max}$.

Question 3:

Si $[S] = 1 \cdot 10^{-2} M$, quelle est la vitesse initiale si la quantité d'enzyme est doublée?

Aide 1 :

Il faut se souvenir, que dans la relation de Michaelis-Menten, $V_{\max} = k_3 [E]$.

De plus si $[S] = 1 \cdot 10^{-2}M$, la concentration initiale est alors très supérieure à K_m alors $V_i = V_{\max} = 75$ nmol/L/min.

Réponse :

Si l'enzyme totale double ($[E'] = 2 [E]$) alors la vitesse maximale double, donc la vitesse initiale double et est égale à 2×75 soit 150 nmol/L/min.

Question 4:

Si $[S] = 0,04 M$, quelle est la concentration en P après 3 min?

Aide 1 :

Si $[S] = 0,04 M$ alors $V_i = V_{\max} = 75$ nmol/L/min ($[S]$ très supérieure à K_m).

La vitesse est donc de 75 nmol/L de produit formé en une minute.

Réponse :

$[P \text{ 3 min}] = 3 \times 75 \text{ nM} = 225 \text{ nM}$

Exercice n°2 :

L'activité d'une enzyme est testée après deux étapes de purification successives :

- étape 1 : 1,2 g de protéine sont récupérés dans 50 ml (extrait 1).
- étape 2 : 0,36 g de protéine sont récupérés dans 12 ml (extrait 2).

La dilution de 20 µmicro de chaque extrait dans 1 ml de milieu réactionnel se traduit par la formation de 1,6 micromole (extrait 1) et 5,9 micromoles (extrait 2) de produit par minute.

Question 1:

Quel est le rendement de la purification ?

Aide 1 :

Il faut calculer le nombre total d'unités d' enzyme avant et après la purification et effectuer le rapport.

Réponse :

Avant la purification : on a 1,6 U dans 20 microl des 50 ml soit un total de 4000 U.

Après la purification : on a 5,9 U dans 20 microl des 12 ml soit un total de 3540 U.

Le rendement de purification est donc de: $(3540 / 4000) \times 100 = 88,5 \%$.

Question 2:

L'activité de l' enzyme est testée sur les mêmes extraits obtenus après purification:

- étape 1 : 1,2 g de protéine sont récupérés dans 50 ml (extrait 1).
- étape 2 : 0,36 g de protéine sont récupérés dans 12 ml (extrait 2).

La dilution de 20 microl de chaque extrait dans 1 ml de milieu réactionnel se traduit par la formation de 1,6 micromole (extrait 1) et 5,9 micromoles (extrait 2) de produit par minute.

Quel est l'enrichissement (=degré de purification) de l' enzyme au cours de la purification ?

Aide 1 :

Il faut calculer l' activité spécifique avant et après la purification et effectuer le rapport.

Réponse :

Avant la purification l' activité spécifique est de 4000 U pour 1200 mg de protéines soit:

$$4000 / 1200 = 3,33 \text{ U / mg.}$$

Après la purification l' activité spécifique est de 3540 U pour 360 mg de protéines soit:

$$3540 / 360 = 9,83 \text{ U / mg.}$$

L'enrichissement est de $9,83 / 3,33 = 3$.

Exercice n°3 :

Un enzyme purifié de masse molaire 800 000 g/mol, catalyse la transformation de S (substrat) en P (produit) avec un $K_m = 10^{-5}$ M. La solution d' enzyme pur, à la concentration de 150 mg/ml, est capable, si la concentration en S est de 1×10^{-2} M, de catalyser la réaction à une vitesse de 3×10^{-5} M/min.

Question 1:

Donnez la définition de l'activité molaire et son unité.

Est-il possible de calculer l'activité molaire de l' enzyme décrit ici ? Si oui, justifiez votre réponse et calculez-la.

Aide 1 :

Pour calculer une activité molaire, il faut :

- 1) Etre en conditions optimales de mesure de la vitesse de réaction, c'est-à-dire, en conditions saturantes de substrat ($[S] \gg K_M$) où $V = V_{\max}$.
- 2) Avoir une solution pure d' enzyme.

Aide 2 :

Il faut connaître la V_{\max} pour calculer l'activité molaire.

Or $[S] = 1 \times 10^{-2}$ M $\gg K_m = 1 \times 10^{-5}$ M (facteur 1000) donc on est en conditions saturantes de S. Cela signifie que la vitesse mesurée à cette concentration en S est la V_{\max} .

Donc $V_{\max} = 3 \times 10^{-5}$ M/min.

Réponse :

L'activité molaire (AM) d'un enzyme se calcule uniquement si l' enzyme est pure et si on se place en conditions saturantes de substrat c'est-à-dire à $V = V_{\max}$!

AM = nombre de moles de produit formés/min/mole d' enzyme .
L'unité est donc la 1/min .

Dans le cas présent on peut calculer AM car la solution d' enzyme est pure et car $[S] = 1 \times 10^{-2}$ M $\gg K_m = 1 \times 10^{-5}$ M (facteur 1000) et donc $V = 3 \times 10^{-5}$ mol de P/L/min = V_{\max} !
AM = V_{\max} / nombre de mole d' enzyme.

L'enzyme catalyse la transformation de 3×10^{-5} mol de P/min pour 1 litre de milieu réactionnel. Or la concentration de l'enzyme est de 150 mg/ml donc dans 1 litre on a :
 $150 \times 10^{-6} \times 1000 = 0,15$ g d'enzyme .

Connaissant son poids moléculaire, on peut en déduire le nombre de moles :
 $0,15 / 8 \times 10^5 = 1,875 \times 10^{-7}$ mole d'enzyme dans un litre de milieu réactionnel.
D'où AM = $3 \times 10^{-5} / 1,875 \times 10^{-7} = 160$ L/min.

Question 2:

Déterminez graphiquement (avec la représentation la plus précise) la vitesse (V) si $[S] = 5 \times 10^{-5}$ M.

Aide 1 :

Deux types de représentations graphiques vous ont été présentées en TD :

- 1) celle de Michaelis-Menten : $v = f([S])$.
- 2) celle de Lineweaver-Burck : $1/v = f(1/[S])$.

La deuxième est plus précise car c'est une droite, alors que la première est une courbe.

Aide 2 :

L'équation de Lineweaver-Burck :

$1/V = (k_m/V_{\max}) \times (1/[S]) + 1/V_{\max}$,
coupe l'axe des abscisses en $(-1/K_m)$ et l'axe des ordonnées en $(1/V_{\max})$.

Réponse :

La représentation de Lineweaver-Burck $1/V = f(1/[S])$

soit : $1/V = (K_M/V_{\max}) \times (1/[S]) + 1/V_{\max}$

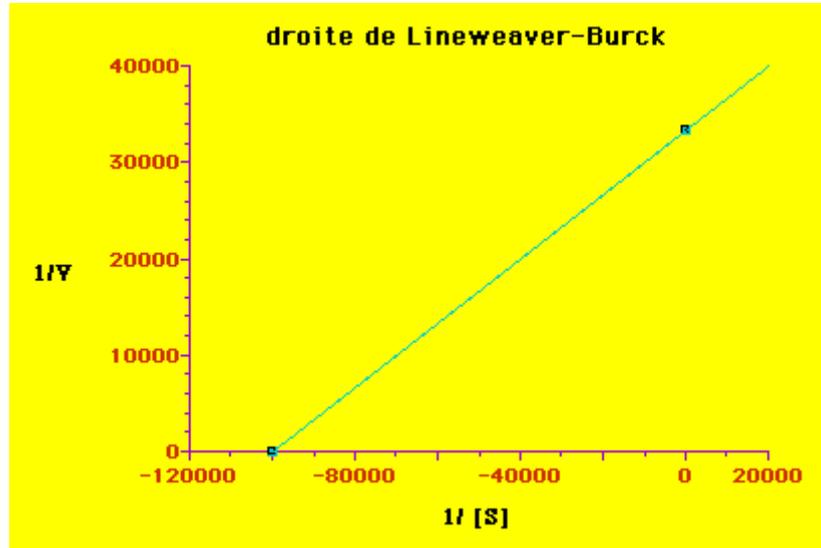
donne une droite qui coupe l'axe des abscisses en $(-1/K_M)$ et l'axe des ordonnées en $(1 / V_{\max})$.
Or on connaît K_M et V_{\max} donc on peut en déduire :

$$-1/K_M = -1/10^{-5} = -1 \times 10^{-5} \text{ L/M}$$

$$1/V_{\max} = -1/3 \times 10^{-5} = 3,33 \times 10^4 \text{ L/M.min.}$$

Pour tracer une droite deux points suffisent. Il ne reste plus qu'à regarder pour le point de la droite ayant pour abscisse $1/(5 \times 10^{-5})$ L/M quelle est son ordonnée ($1/V$). L'inverse de ce nombre, c'est la vitesse à $[S] = 5 \times 10^{-5}$ M.

D'après le graphique : $1/V = 40000$ donc $v = 2,5 \times 10^{-5}$ M/min.



Exercice 4 :

Un étudiant en biochimie arrive en retard à un examen pratique dont voici l'énoncé :

Soit E un enzyme qui transforme S (substrat incolore) en P (produit jaune). Vous réaliserez à partir d'une solution de S à 1M les dilutions suivantes auxquelles vous ajouterez E et incuberez 10 minutes à 37°C. Le volume final est de 1 ml. Vous prendrez ensuite la DO 410 nm.

[S] : $10^{-3}M$; $2 \times 10^{-3}M$; $3 \times 10^{-3}M$; $5 \times 10^{-3}M$; $10^{-2}M$; $2 \times 10^{-2}M$; $3 \times 10^{-2}M$; $10^{-1}M$; $2 \times 10^{-1}M$ et $3 \times 10^{-1}M$.

Vous déterminerez graphiquement K_m (en M) et V_{max} (en mmoles/min) de l' enzyme pour S.

On vous rappelle l'équation de Michaelis-Menten:

$$V = (V_{max}[S]) / (K_m + [S]) \text{ et } e = 5000 \text{ L/mol/cm.}$$

N'ayant plus assez de temps notre étudiant décide de résoudre son problème différemment et ne fait les mesures que pour 2 valeurs de [S] :

- DO = 0,25 pour [S] = $5 \times 10^{-3} M$
- DO = 0,35 pour [S] = $10^{-2} M$

Question 1:

Comment passe-t-on de la DO à 410 nm à la vitesse en mmoles/min ?

Calculer la vitesse pour les deux valeurs de DO données.

Aide 1 :

Penser à utiliser ϵ le coefficient d'extinction molaire...

Aide 2 :

La loi de Beer-Lambert : $DO = \epsilon l c$

Réponse :

Etant donné la loi de Beer-Lambert : $DO = \epsilon.l.c$, la DO reflète la concentration en produit formé car le produit absorbe à 410 nm alors que le substrat est incolore. De plus la vitesse est en mmol/min or connaissant la concentration (grâce à la DO), le volume final (1 ml) et le temps de la réaction (15 min), on peut calculer la vitesse.

a) $DO = 0,25 = 5000 \cdot l \cdot c$ d'où $c = 5 \times 10^{-5}M$.

Dans 1 ml final (soit $10^{-3} L$) on a $5 \times 10^{-5} \times 10^{-3} = 5 \times 10^{-8}$ moles de P formées en 15 min d'où $V = 5 \times 10^{-8} / 15 = 3,3 \times 10^{-3}$ mmol/min.

b) Pour $DO = 0,35$ alors $c = 7 \times 10^{-5} M$ et la vitesse $V = 4,6 \times 10^{-3}$ mmol/min.

Question 2:

Quel est la démarche de l'étudiant, déterminez K_m et V_{max} et recherchez les risques.

Aide 1 :

La représentation de Michaelis-Menten n'est pas appropriée....

Aide 2 :

La représentation de Lineweaver et Burk est une droite (qui peut être déterminé dans un cas extrême par deux points seulement....)

Réponse :

L'étudiant n'a le temps de faire les mesures que pour deux concentrations en S. Cela donne deux vitesses pour deux concentrations différentes. On ne peut tracer que deux points, ce qui est insuffisant pour tracer la courbe de Michaelis et Menten pour laquelle il faut suffisamment de points expérimentaux pour pouvoir déterminer le plateau de la courbe qui correspond à la V_{max} . Cependant deux points peuvent suffire dans un cas extrême pour tracer la droite de la représentation de Lineweaver et Burk : $1/V = 1/V_{max} [S]^{-1} + 1/K_m$.

On peut alors déterminer V_{max} et K_m .

Néanmoins, une telle démarche est risquée car si on utilise deux points expérimentaux pour des concentrations en S saturantes, on commet une erreur importante pour la détermination de K_m et V_{max} . Les points valables pour une telle représentation sont ceux qui, sur la courbe de Michaelis Menten, se situent sur la partie linéaire de la courbe. La représentation de Lineweaver et Burk est une droite expérimentale, il est donc normalement nécessaire d'avoir plusieurs points expérimentaux pour la tracer.

En conclusion, si l'étudiant a réagi de façon ingénieuse devant son problème de temps, il a néanmoins pris un risque important en ne déterminant que deux points expérimentaux.

Résultats numériques : $V_{\max} = 7,4 \times 10^{-3}$ mmol/min et $K_m = 6,1 \times 10^{-3}$ M (d'après le graphique ci-dessous).

