

Université Mustapha Ben Boulaid Batna-2

Faculté : SNV

Département : Microbiologie/Biochimie

Spécialité : Microbiologie (L3)

TD3 d'enzymologie

Exercice 01 : La glucokinase catalyse la réaction suivante :



On donne la constante de Michaelis de la glucokinase De *Bacillus stearothermophilus* pour les substrats suivants :

Substrat	K _m (M)
ATP :	6,10 ⁻⁵
ITP :	6,10 ⁻⁴
GTP	1,2 .10 ⁻³
UTP	4,5.10 ⁻³
CTP	3,6. 10 ⁻³

Classer les substrats par ordre d'affinité apparente croissante pour la glucokinase.

Solution exercice01 :

En premier lieu on donne la définition du K_m

K_m : correspond à la valeur de la concentration du substrat [S] pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est égale à **la moitié** de la vitesse maximale (V_{max})-

-Son unité est mole/litre ou Molaire est relié à la constante de **dissociation** de l'enzyme à son substrat

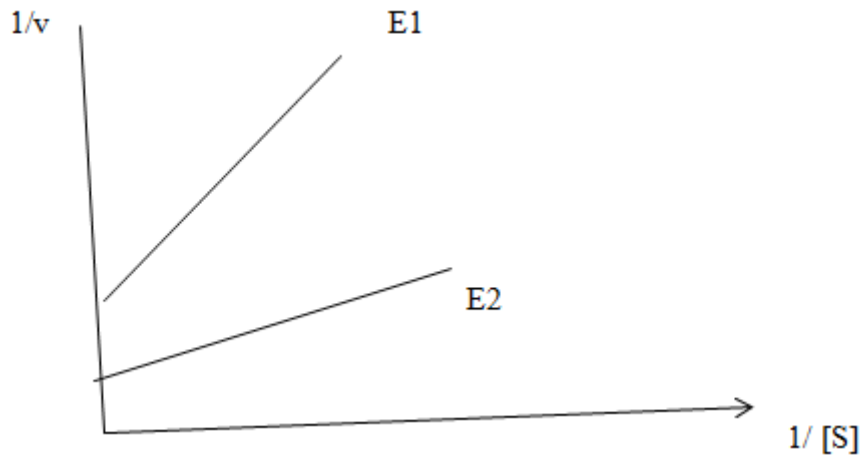
-K_m est inversement proportionnel avec l'affinité, plus le K_m élevé ,plus que la [S] du substrat est nécessaire à une activité importante de l'enzyme est élevée.

Cela traduit en générale une affinité faible (K_m élevé l'affinité est faible) et le classement des substrats selon l'ordre d'affinité croissante pour la glucokinase est présenté dans le tableau suivant :

K _m (M)	Classement des substrats selon l'ordre d'affinité croissante.
4.5.10 ⁻³ (0.0045) (K _m le plus élevé)	UTP (affinité la plus faible).
3.6.10 ⁻³ (0.0036)	CTP
1.2.10 ⁻³ (0.0012)	GTP
6.0.10 ⁻⁴ (0.0006)	ITP
6.0.10 ⁻⁵ (0.00006) (K _m le plus faible)	ATP (affinité la plus élevée)

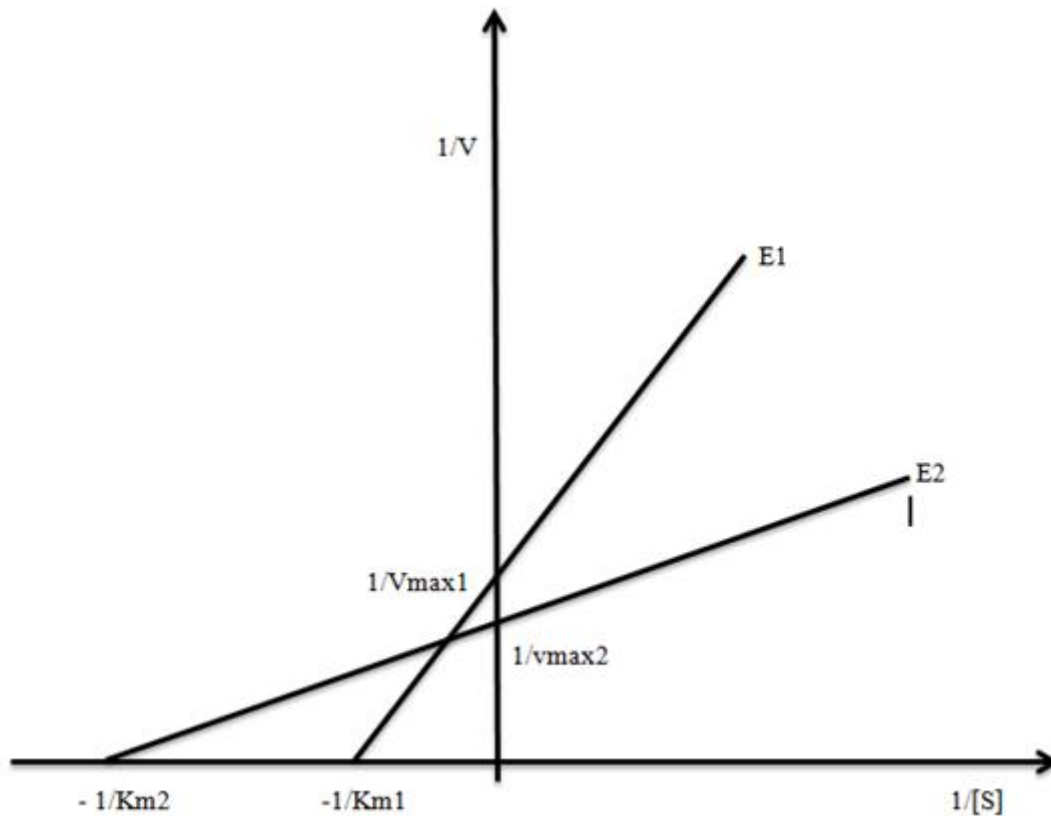
Exercice 02 :

Dans le schéma ci-dessous, on trouve reporter, selon la présentation de Lineweaver-Burk les résultats d'une cinétique d'une enzyme E1 normale et de l'enzyme mutée E2, qui ne diffère de E1 que par la substitution d'un radical valyl par un autre acide α -aminé.



- A- Commenter l'affinité d'E1 et E2 pour SB- Laquelle de ces 2 enzymes a la plus grande activité moléculaire (on suppose les concentrations de E1 et E2 égales).
- C- L'étude électrophorétique de ces 2 mêmes enzymes E1 et E2 montre qu'à pH : 7, l'enzyme mutée E2 se déplace plus rapidement vers l'anode que l'enzyme E1.
- D- Donner les noms de 2 acides α -aminés qui ont pu y remplacer la valine.

Solution d'exercice 2 :



A)- Si on prolonge les 2 droites $1/V = f(1/[S])$ pour les 2 enzymes **E1** et **E2** jusqu'à ce qu'elles coupent l'axe des abscisses ($1/[S]$), la valeur de chacune d'elle nous indique que :

$1/K_{m1} < 1/K_{m2}$ donc **$K_{m1} > K_{m2}$** (voir le graphique ci-dessous).

Si K_{m1} est plus grand que K_{m2} , c'est que E1 a moins d'affinité pour le substrat que l'enzyme mutée (E2).

B)- l'activité moléculaire d'une enzyme est proportionnelle à la concentration d'enzyme et à la vitesse, à partir du graphique ci-dessous on constate que $1/v_{max2} < 1/v_{max1}$

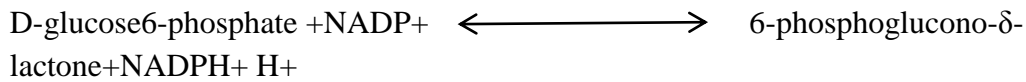
Donc **$V_{max1} < V_{max2}$** .

E2 a la plus grande activité moléculaire car à la même concentration d'enzyme (E1 et E2), la vitesse maximale est supérieure avec E2.

C)- à pH=7, si E2 se déplace plus rapidement que E1 vers l'anode(+) c'est qu'elle contient un acide μ aminé plus électronégatif que la valine comme aspartique et glutamique qui en outre à l' α -COOH, possèdent un autre groupement carboxylique dans leurs chaînes latérales qui s'ionise à ce pH7, contribuant à l'augmentation de l'électronégativité de ces deux acides aminés (Glu et Asp).

Exercice .3

La glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6-PD) catalyse la réaction suivante :



Les constants de Michaelis de la G6-PD érythrocytaire humaine normale pour le D-glucose 6-phosphate et le NADP⁺ sont respectivement $6 \cdot 10^{-5}$ M et $6 \cdot 10^{-6}$ M ; les constantes de Michaelis du variant pathologique Gd(-) Mali de cette enzyme pour les mêmes substrats sont respectivement $2 \cdot 10^{-5}$ et $5.5 \cdot 10^{-6}$ M.

1-Qu'en déduisez-vous sur l'affinité de l'enzyme pathologique pour ces deux substrats ?

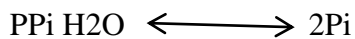
2-Qu'en déduisez-vous sur l'activité de l'enzyme pathologique par rapport à l'enzyme normale

Solutions exercice 3 :

- L'affinité de G6pD Gd(-) Mali ($K_m = 2 \cdot 10^{-5}$) pour le D-G6ph est un peu modifiée (par rapport à la G6pD normale ($K_m = 6 \cdot 10^{-5}$)).
- L'affinité n'est pas sensiblement modifiée pour le NADP⁺ (K_m pour l'enzyme normale = $6 \cdot 10^{-6}$ K_m de la variant pathologique = $5.5 \cdot 10^{-6}$).

Exercice 04 :

La pyrophosphatase catalyse la réaction suivante :



On mesure V_i (μmole de Pi formé par minute) pour différentes concentrations initiales de PPi avec la pyrophosphatase d'*Aspergillus oryzae*

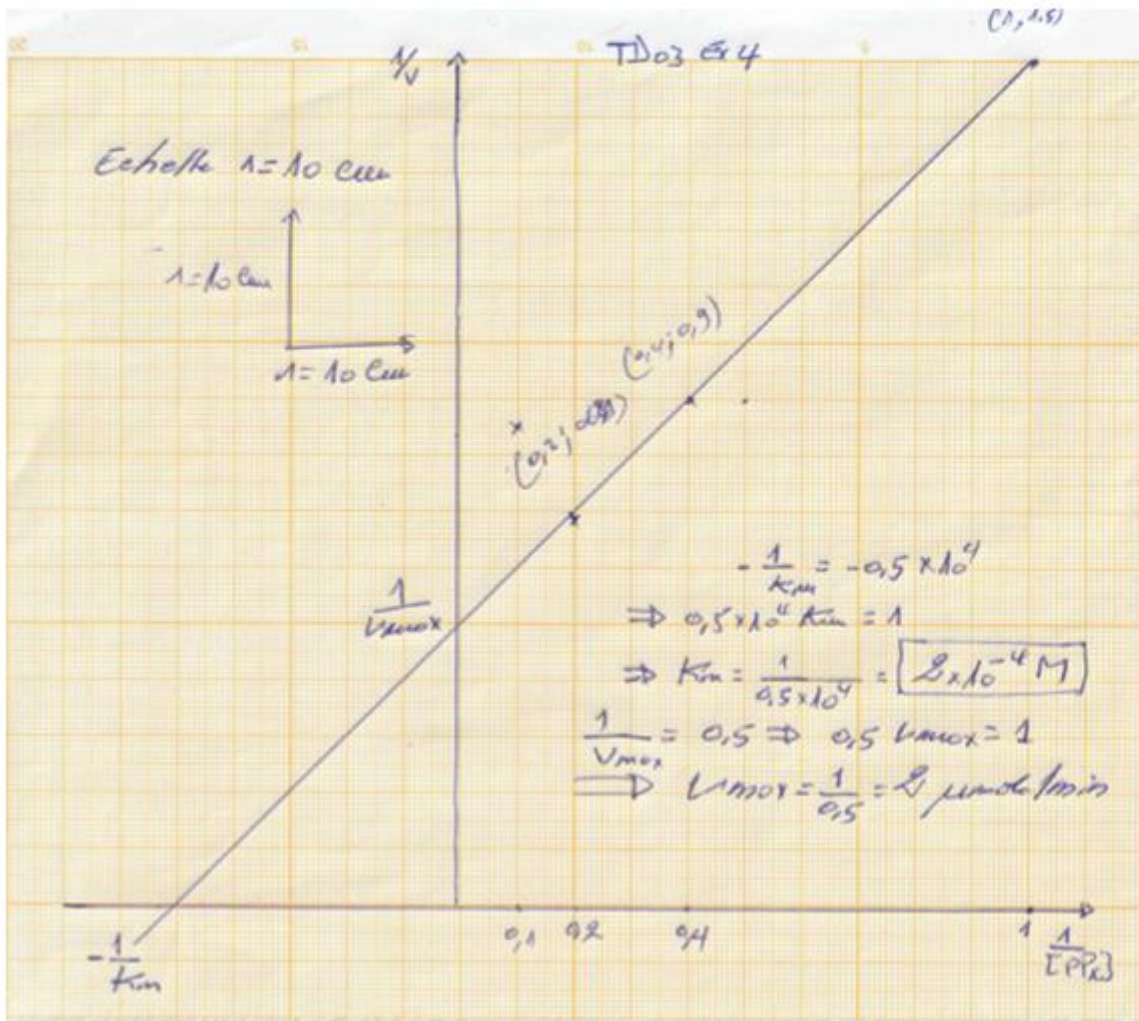
PPi $\times 10^4$ M	$1/[\text{PPi}] \times 10^4 \text{M}$	V_i (μ mole /min)	$1/V$
1.00	$1.0 \cdot 10^{-4}$	0.667	1.50
2.5	$0.4 \cdot 10^{-4}$	1.11	0.90
5	$0.2 \cdot 10^{-4}$	1.430	0.699
10	$0.1 \cdot 10^{-4}$	1.170	0.85

A l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk, déterminer K_m et V_{max} .

Solution exercice 04 :

Pour la représentation de Lineweaver-Burk, on doit calculer $1/[\text{PPi}]$ et $1/V$ (tableau ci-dessous)

PPi $\times 10^4$ M	$1/[\text{PPi}] \times 10^4 \text{M}$	V_i (μ mole /min)	$1/V$
1.00	$1.0 \cdot 10^{-4}$	0.667	1.50
2.5	$0.4 \cdot 10^{-4}$	1.11	0.90
5	$0.2 \cdot 10^{-4}$	1.430	0.699
10	$0.1 \cdot 10^{-4}$	1.170	0.85



A partir du graphique on a :

$$-1/K_m = -0.5 \cdot 10^4 \longrightarrow 0.5 \cdot 10^4 K_m = 1 \longrightarrow K_m = 1/0.5 \cdot 10^4 = 2 \cdot 10^{-4} M$$

$$1/V_{max} = 0.5 \longrightarrow 0.5 V_{max} = 1 \longrightarrow V_{max} = 1/0.5 = 2 \mu \text{ mole/min}$$