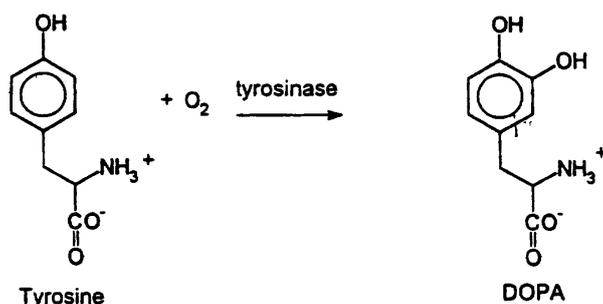


TP 8 : enzymologie

Exercices de cinétique enzymatique

Exercice 1 : la tyrosine kinase

La mélanine est un pigment brun que l'on trouve par exemple dans les cheveux et la peau. La première étape de la synthèse de la mélanine est catalysée par l'enzyme tyrosinase et est résumée par l'équation bilan suivante :



On a mesuré l'évolution de la concentration en tyrosine au cours du temps dans des mélanges réactionnels comportant :

- 0,3 mL de solution d'enzyme tyrosinase (concentration identique dans tous les mélanges)
- 3 ml de solution de tyrosine à concentration variable : 1, 2 ou 4 g/L
- éventuellement 0,003 mL de solution d'hydroquinone (concentration 10 g/L)

Le graphique donne les résultats expérimentaux.

- **Mesurer** sur le graphique la vitesse initiale des réactions enzymatiques ; **inscrire** les vitesses obtenues dans le tableau ci dessous ; **préciser** l'unité de la vitesse initiale calculée

Conditions expérimentales			Vi mesurée (unité =.....)
Numéro de la courbe	Concentration en tyrosine (g/L)	Avec ou sans hydroquinone	
α	1	Sans	
β	2	Sans	
γ	4	Sans	
δ	2	Avec	
ε	4	Avec	

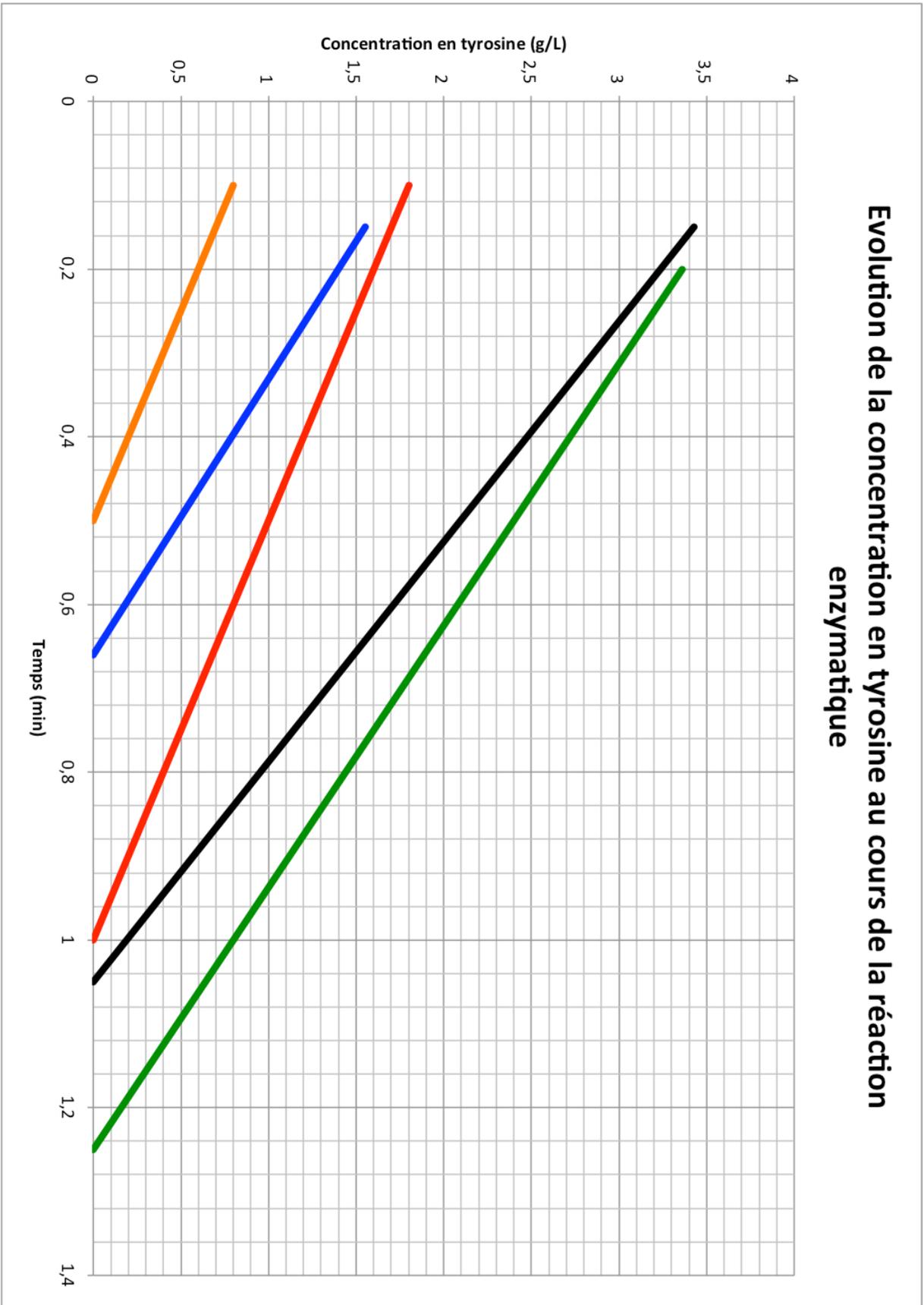
- A partir des vitesses mesurées, **réaliser** une représentation graphique, sur papier millimétré, permettant d'accéder aux valeurs caractéristiques de l'enzyme (Km, Vmax) avec ou sans hydroquinone.

- **Relever** sur le graphique les valeurs caractéristiques (Km, Vmax)

- **Interpréter** l'effet de l'hydroquinone sur l'enzyme. La formule de l'hydroquinone est fournie :



Evolution de la concentration en tyrosine au cours de la réaction enzymatique



Exercice 2 : comparaison de deux enzymes de spécificités similaires**(ENSG 1998, modifié)**

Le foie contient deux enzymes à cinétique mickaélienne, l'hexokinase (HK) et la glucokinase (GK), toutes deux capables de phosphoryler le glucose selon la réaction :



On sépare ces deux enzymes et leurs vitesses initiales, V1 pour HK et V2 pour GK, sont mesurées en fonction de la concentration en glucose. La concentration en ATP est maintenue saturante. Le tableau ci-dessous donne les résultats obtenus. Les vitesses sont exprimées en unités internationales par gramme de foie.

Glucose° mM/L	0.05	0.1	0.5	1	5	10	15	150	500	1500
V1	0.15	0.2	0.27	0.29	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
V2		0.01	0.03		0.25	0.4	0.5	0.91	0.97	1

- 1- Donnez la formule chimique du glucose et du glucose-6-phosphate.
- 2- Rappelez pourquoi on travaille sur des vitesses initiales pour étudier l'activité enzymatique ;
- 3- Déduire du tableau les Km et Vmax des deux enzymes sans construction graphique. Justifiez votre démarche.
- 4- Commentez la signification biochimique de la différence des valeurs de Km.
- 5- Expliquez l'évolution de V1 entre 0.05 et 0.5 mM de glucose et entre 5 et 1500 mM de glucose
- 6- Représentez graphiquement les résultats du tableau, en utilisant la représentation de Lineweaver et Burk, sur deux figures distinctes. Pour chaque figure, choisissez les échelles adéquates, identifiez les points remarquables et précisez leur valeur.
- 7- Les mesures des vitesses sont maintenant effectuées en présence de glucose-6-phosphate ajouté au mélange réactionnel de départ. Le tableau ci-dessous donne les résultats obtenus :

Enzyme	Glucose-6-phosphate ajouté	Km	Vmax
HK	0.4 mM/L	0.05mM/L	0.2 UI
GK	65 mM/L	40 mM/L	1 UI

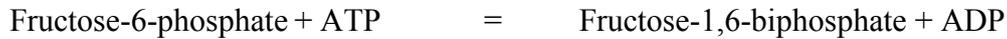
Complétez les deux représentations de Lineweaver et Burk en présence de glucose-6-phosphate.

- 8- Commentez le cas de HK en donnant une interprétation moléculaire de la situation expérimentale observée.
- 9- Même travail pour GK.
- 10- HK est présente dans les cellules de tous les tissus sauf les cellules « parenchymateuses » ; elle catalyse la première étape de la glycolyse. GK n'est présente que dans les cellules « parenchymateuses » du foie, cellules qui mettent le glucose en réserve sous forme de glycogène après un repas.

Sachant que la masse molaire du glucose est de 180g/mol et que la glycémie des Mammifères est d'environ 0.9 g/L, sachant que la concentration intrahépatique de glucose est égale à la glycémie, mettez en évidence la différence d'activité régulatrice de la phosphorylation du glucose des deux enzymes ? Quel est l'intérêt biologique de cette différence ?

Exercice 3 : étude d'une enzyme allostérique

La PFK1 ou phospho fructo kinase 1 est une enzyme qui catalyse la troisième réaction de la glycolyse ; on rappelle que la glycolyse est une série de réactions cytosoliques qui produisent deux ATP par glucose dégradé :

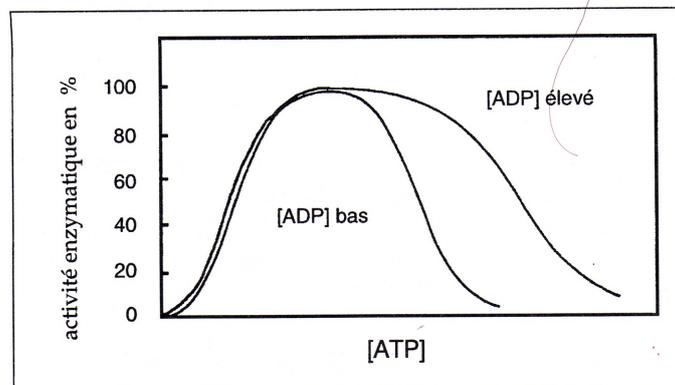


On étudie l'évolution de la vitesse initiale de cette réaction en fonction de la concentration en fructose-6-phosphate, pour différentes valeurs de la concentration en ATP, et pour une concentration initiale constante en enzyme.

Concentration en fructose 6P (mM)	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3	
Vi en pourcentage de Vmax	8	35	80	95	100	100	100	100	+ 0.1 mM d'ATP
Vi en pourcentage de Vmax	0.5	1.4	5	38	55	75	96	100	+ 1 mM d'ATP et 0.1 mM d'AMP
Vi en pourcentage de Vmax	0.3	0.5	2	5	10	23	45	65	+ 1 mM d'ATP

- 1- Tracez les vitesses en fonction des concentrations en substrats. Mesurez K0.5.
- 2- Déduire des courbes obtenues l'effet de l'ATP et de l'AMP sur PFK1.

On dose ensuite l'activité de l'enzyme (en pourcentage de l'activité maximale possible), en fonction de la concentration en ATP, pour deux concentrations en ADP.



- 3- Analysez les courbes obtenues.

- 1- Donnez la formule du substrat de la trypsine.

Des mutations sont introduites dans le gène codant la trypsine, de façon à produire des enzymes modifiées pour 1 ou 2 résidus aminés.

La constante de Mickaélis des différentes enzymes a été mesurée en présence d'un substrat synthétique.

Enzymologie expérimentale

La cinétique d'une enzyme, suivie par oxymétrie

Matériel d'étude : la **glucose-oxydase** (GOD) est une enzyme extraite du milieu de culture des champignons comme *Aspergillus niger* ou *Penicillium notatum*. Cette enzyme catalyse l'oxydation aérobie du glucose en gluconolactone ; la gluconolactone se transforme alors spontanément en acide glucuronique.



Travail à rendre par binôme : graphique de la vitesse initiale de l'enzyme en fonction de la concentration initiale en substrat ; valeur de V_{\max} et K_m

C'est un travail quantifié, qui nécessite une mesure correcte des volumes et une maîtrise des dilutions.

On suivra cette réaction par la disparition du substrat oxygène dans l'enceinte expérimentale.

ETAPE 1 : Préparation de plusieurs solutions de substrat

Les substrats de l'enzyme sont le dioxygène et le glucose.

Nous disposons d'une solution mère de glucose à 0.1 g/L. Préparer dans des pots 100 mL de

- | | |
|------------------------|---|
| 1- Solution à 0.05 g/L | |
| 2- Solution à 0.02 g/L | <i>attention à la précision des dilutions !</i> |
| 3- Solution à 0.01g/L | <i>Rediluez vos solutions, ne partez pas</i> |
| 4- Solution à 0.005g/L | <i>systématiquement de la solution mère.</i> |

Nous disposons aussi d'une solution d'enzyme Glucose Oxygase de concentration C, à maintenir au froid.

ETAPE 2 : Réaction enzymatique et suivi de la disparition du dioxygène

Ouvrir le logiciel Logger Pro permettant le suivi de la concentration en dioxygène dans l'enceinte réactionnelle.

L'enceinte contient une sonde à dioxygène précédemment étalonnée, dont l'embout est fragile. Veillez en particulier à ce que la sonde ne touche pas l'agitateur.

Les mesures s'effectueront sur 2 minutes.

Pour les 5 concentrations en glucose :

- Commencer par la solution la moins concentrée
- Verser mL de solution de glucose dans l'enceinte réactionnelle. Mettre en route l'agitation.
- Insérer la sonde à O₂ : on considèrera que l'enceinte fermée n'échange pas de dioxygène avec l'atmosphère : la sonde doit être immergée mais protégée de l'agitateur.
- Lancer immédiatement la mesure et ajouter avec la seringue..... mL de solution d'enzyme glucose oxydase (froide, à chercher dans la glace au moment)

- Suivre la construction d'une courbe donnant la quantité de dioxygène dans l'enceinte réactionnelle en fonction du temps : celle-ci doit être décroissante.
- Mesurer sur le graphe V_i (voir paragraphe suivant) avant de lancer la mesure suivante.

ETAPE 3 : Calcul des vitesses initiales

Les courbes expérimentales permettent de calculer la vitesse initiale des 5 réactions enzymatiques : **V_i est la pente de la tangente à la courbe au démarrage de la réaction** (soit après un délai de 10 à 20 secondes).

On peut mesurer à l'écran (précision...) ou utiliser la fonction « pente » pour obtenir les coordonnées.

Rentrer ces données dans un tableur

ETAPE 4 : avec le tableur :

- remplir deux colonnes : concentrations de substrat, v_i calculée
 - faire construire la courbe demandée v_i en fonction de S (format nuage de point).
 - demander la courbe de tendance
 - imprimer
 - légender la courbe imprimée pour présenter les caractéristiques importantes des résultats obtenus.
- produire de même la courbe en double inverse (Lineweaver et Burk)

ETAPE 5 : données complémentaires

On mesure V_i (en μ moles de substrat consommées par minutes) pour différentes concentrations initiales de glucose (en μ mol/L), en présence ou en absence des inhibiteurs, à 37°.

Concentration du glucose $\times 10^{-2}$	Vitesse initiale V_i		
	Inhibiteurs absents	Avec 10^{-6} mol/L d'inhibiteur I1	Avec 10^{-6} mol/L d'inhibiteur I2 (I2 = luminol)
2	5	2.5	3.8
5	7.14	3.57	6.13
7.5	7.87	3.95	
10	8.34	4.17	7.69
20	9.09	4.54	8.69

- 1- Sur un même graphique, représentez $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$ dans les trois cas. En déduire les valeurs de V_{max} et K_m dans les trois cas.
- 2- Quels types d'inhibiteurs sont I1 et I2 ?
- 3- Proposez un modèle réactionnel de chaque inhibition.