TP/TD ENZYMOLOGIE BCPST 1.2

Séance du lundi 12/06/2022

Objectifs du TP :

Analyser et interpréter des données portant sur des cinétiques michaeliennes en présence ou non d'inhibiteurs

Interprétation du fonctionnement enzymatique en termes de structure moléculaire (avec Rastop)

Utilisation des techniques de chromatographie pour l'étude des protéines

Détermination de Km et Vmax avec un tableur.

Ce TP/TD se rapporte au **chapitre SV-E-3** Les enzymes et la catalyse des réactions et **SV-D-2-4** Acides aminés et protéines. Il s'agit d'appliquer les connaissances acquises sur la structure des protéines et sur le fonctionnement des enzymes :

Capacités exigibles en séances pratiques pour le chapitre SV-E-3

- Réaliser le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :
  - Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale ;
  - Construction d'une courbe vi = f([S]0) et linéarisation en double inverse ;
  - Détermination de KM, vmax et de l'efficacité catalytique.
- Relier la spécificité de substrat et de réaction à la structure tridimensionnelle et aux interactions du complexe enzyme-substrat.
- Exploiter des données de modélisation moléculaire.

1. Etude comparée de l'activité de deux enzymes (Géologie de Nancy 1998, modifié)

Le foie contient deux enzymes à cinétique michaélienne, l'hexokinase (HK) et la glucokinase (GK), toutes deux capables de catalyser la phosphorylation du glucose selon la réaction:

Glucose + ATP -------> Glucose-6-phosphate + ADP

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 initiales sont exprimées en unités internationales par gramme (g) de foie et on estime que la séparation des deux enzymes a été effectuée sans perte d'activité.

[Glucose] en mM.L^{-1}	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	0,01	0,03	0,06	0,25	0,40	0,50	0,91	0,97	1,00

a. *Expliquez pourquoi les biochimistes doivent travailler sur les vitesses initiales pour étudier l'activité enzymatique.*
b. *Déduire du tableau les Km et Vm des deux enzymes sans calcul ni construction graphique. Justifiez votre démarche.*

Exercice 1

a. La concentration en substrat est bien définie, l'enzyme est à l'état natif et la faible concentration de produit ne modifie pas la réaction.

b. Km est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égalke à Vm/2. Pour HK, km = 0,05 mM. L^{-1} et pour GK, km = 15 mM. L^{-1}. HK est donc environ 300 fois plus affine pour le glucose que GK.

HK est présente dans les cellules de tous les tissus sauf les cellules parenchymateuses du foie. Elle catalyse une des premières étapes de la glycolyse.
GK n'est présente que dans les cellules parenchymateuses du foie qui mettent le glucose en réserve sous forme de glycogène après un repas. Elle catalyse la première réaction de la voie métabolique de cette mise en réserve.

c. *Sachant que la masse molaire du glucose est de 180 g.mol-1 et que la glycémie des mammifères est d'environ 0,9 g. L^{-1}, sachant que la concentration intracellulaire hépatique de glucose est égale à la glycémie, les deux enzymes présentent-elles la même activité régulatrice de la phosphorylation du glucose ? Quel est l'intérêt biologique de cette différence ?*

Les mesures des vitesses sont maintenant effectuées en présence de glucose-6-phosphate ajouté au mélange réactionnel de départ contenant une des deux enzymes isolées. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

Enzyme	Glucose 6-P	Km	Vmax
Hexokinase (HK)	0,4 mM. L^{-1}	Constant	Diminué
Glucokinase (GK)	65 mM. L^{-1}	Augmenté	Constante

d. *Interprétez les résultats obtenus.*
e. *Quel intérêt biologique pour la cellule présente le phénomène mis en évidence ?*

c. Une glycémie de 0,9 $g.L^{-1}$ représente 0,9/180 soit 5 $mM.L^{-1}$. Le Km de HK étant 100 fois plus faible que la glycémie, cela signifie que cet enzyme fonctionnera toujours à sa vitesse maximale (partie horizontale de la courbe). La phosphorylation du glucose sera donc permanente permettant ainsi aux cellules d'initier la glycolyse, assurant ainsi leur approvisionnement énergétique.

Par contre, le km de GK est 3 fois plus élevé que la concentration hépatique de glucose. L'enzyme travaille donc toujours à proximité de sa viteses initiale (partie linéaire de la courbe). Sa vitesse dépendra donc de la concentration en glucose. Quand celle-ci augmente, la mise en réserve sera plus importante tandis que lorsqu'elle diminue, la mise en réserve sera atténuée. GK joue donc un rôle régulateur de la glycémie. L'intérêt biologique de cette différence est donc évident : HK permet l'approvisionnement énergétique optimal tandis que GK participe au contrôle de la glycémie.

d. Tableau résumé

Enzyme	HK	GK
Activité	diminue	Cte
Affinité	Cte	diminue
Type d'inhibition	Non compétitive	Compétitive

Il faut 162,5 fois plus de G6P dans le cas de GK ce qui suggère une moins grande sensibilité de cette enzyme à l'inhibiteur.

e. L'intérêt biologique peut s'appréhender à deux niveaux :

- ✓ Organisme : mise en réserve hépatique du glucose en cas d'hyperglycémie (glycogénogénèse) ou sa libération en cas d'hypoglycémie (glycogénolyse)
- ✓ Cellulaire : approvisionnement constant en substrat pour le métabolisme énergétique puisque la phosphorylation du glucose est l'étape d'engagement de la glycolyse qui se poursuit par la respiration mitochondriale en situation aérobie.

2. Etude de la phosphatase alcaline.

La phosphatase alcaline hydrolyse les monoesters de l'acide phosphorique. Le substrat utilisé pour cette étude cinétique est le p-nitrophénylphosphate de sodium (ou PNPP). La réaction est suivie en dosant spectrophotométriquement le p-nitrophénol (PNP) libéré par hydrolyse du substrat. La vitesse initiale de la réaction a été mesurée pour des concentrations différentes en substrat à 15°C et à pH 9,87. Trois essais ont été réalisés :

- 1er essai : en l'absence d'effecteur.
- 2e essai : en présence de β-glycérophosphate à la concentration de 2.10^{-3} $mol.l^{-1}$.
- 3e essai : en présence de cystéine à la concentration de 5.10^{-6} $mol.l^{-1}$. Les résultats expérimentaux sont reproduits dans le tableau ci-dessous.

Concentration du substrat (en $mol.l^{-1}$)	1er essai Vitesse initiale (U. arb)	2e essai Vitesse initiale (U. arb)	3e essai Vitesse initiale (U. arb)
1.10^{-4}	83.10^{-5}	51.10^{-5}	58.10^{-5}
2.10^{-4}	132.10^{-5}	88.10^{-5}	91.10^{-5}
5.10^{-4}	200.10^{-5}	154.10^{-5}	138.10^{-5}

1. *Représentez sur le même graphique de Lineweaver et Burk les courbes relatives à ces 3 essais. Vous prendrez une couleur différente pour chaque cas.*
2. *Déterminez les valeurs de Km et de Vm à partir de ces courbes.*
3. *Comment se comportent le β-glycérophosphate et la cystéine vis à vis de l'enzyme ? Justifiez.*

1/S	1/Vi Absence d'effecteur	1/Vi Présence de b-glycérophosphate	1/Vi Présence de cystéine
10000	1204,8	1960,8	1724,1
5000	757,6	1136,4	1098,9
2000	500	649,4	724,6

On part de $1/Vi = Km/Vmax.1/[S] + 1/Vmax$

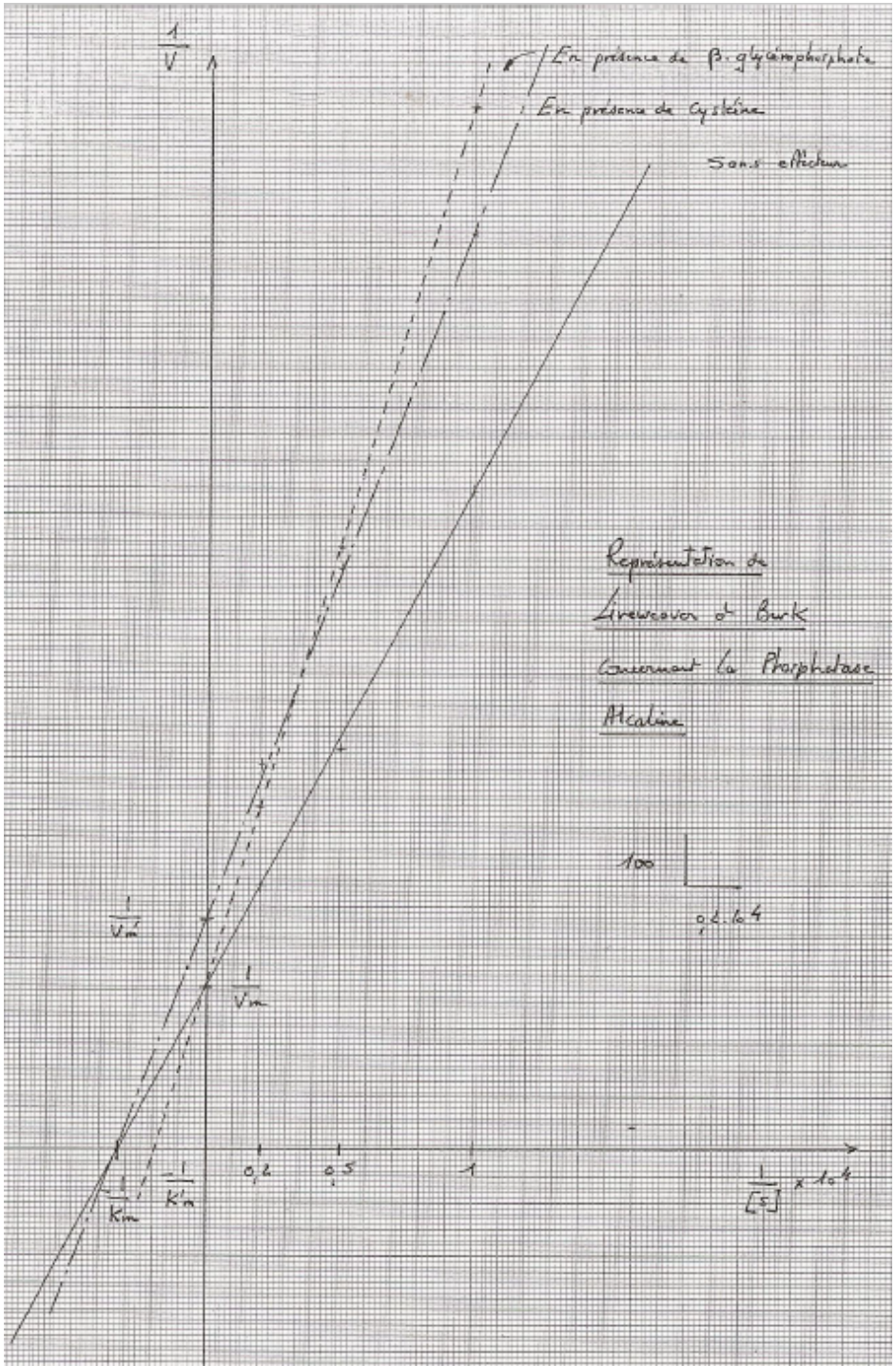
Graphiquement $1/Vm = 310$ aux incertitudes près, donc $Vm = 322\ 10^{-5}$ UA

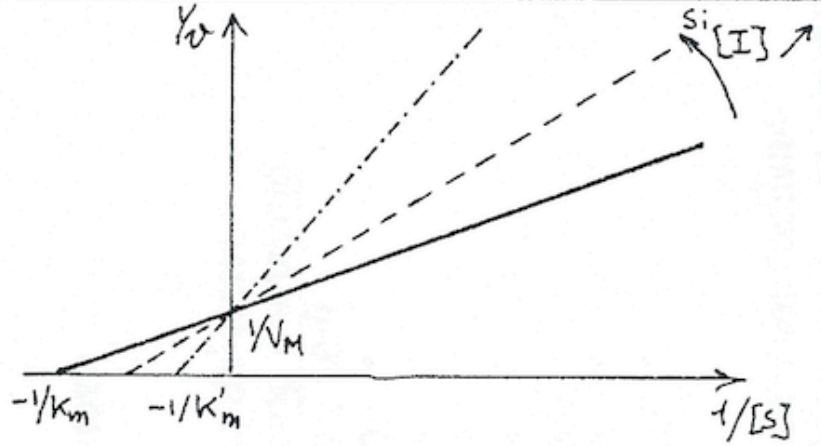
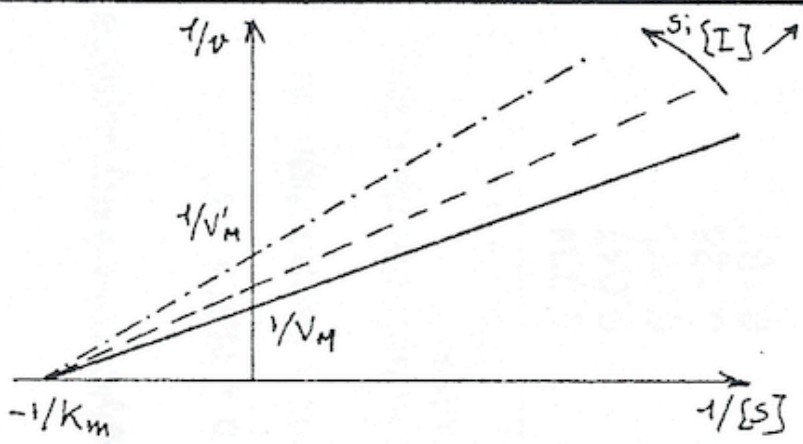
$-1/Km = -0,34\ 10^{4} \rightarrow Km = 2,94\ 10^{-4}$ mol/l

$1/Vm' = 440 \rightarrow Vm' = 227\ 10^{-5}$ UA avec la cystéine.

$-1/Km' = -0,2.10^{4} \rightarrow Km' = 5.10^{-4}$ mol/l avec le b glycérophosphate.

3- Donc le β glycérophosphate se comporte comme un inhibiteur compétitif puisque l'affinité diminue (Km augmente) alors que la cystéine est un inhibiteur non compétitif qui diminue Vm sans modifier l'affinité de l'enzyme pour le substrat.



I. Compétitif	I. Non Compétitif
	
Si [I] augmente, la courbe se redresse en pivotant autour de $1/V_M$	Si [I] augmente, la courbe se redresse en pivotant autour de -1/Km

Il suffit d'augmenter [S] pour lever l'inhibition, car alors toute l'enzyme est statistiquement engagée dans E-S

V_M ne change pas

$$K'm = Km \left[1 + \frac{[I]}{Ki}\right]$$

ce qui signifie que K'_m augmente avec [I], et l'affinité diminue

Il n'est pas possible de lever l'inhibition en augmentant [S] car l'enzyme est modifiée par I. L'affinité de l'enzyme pour S ne change pas car il n'y a pas de compétiteur $\rightarrow$ Km ne change pas

$$V'm = \frac{Vm}{\left[1 + \frac{[I]}{Ki}\right]}$$

Si [I] $\uparrow$, alors $\frac{1}{V'_{M.}} \uparrow$ et $V'_{M.} \downarrow$

3. La cinétique enzymatique

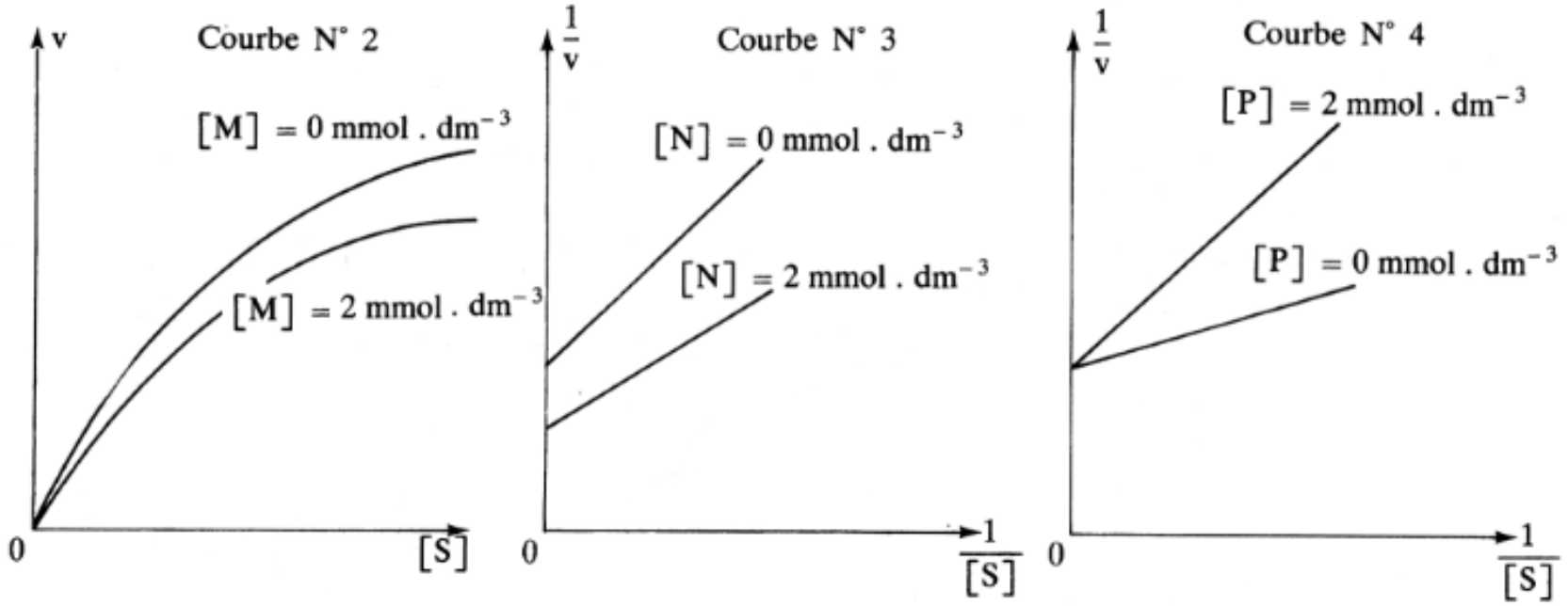
Le tableau ci-dessous traduit la cinétique de la transformation d'un substrat S en l'absence et en présence d'une substance F.

[S] en $mmol.dm^{-3}$	1	1,5	2	3	4	8	16	20
mmol de S transformées/min	0,15	0,21	0,25	0,30	0,33	0,40	0,42	0,42
mmol de S transformées/min en présence de F	0,06	0,08	0,10	0,12	0,13	0,155	0,16	0,16

1. *Sans construire la courbe, déterminer la vitesse maximale et la constante de Michaélis en l'absence et en présence de F.*

On mesure la vitesse de transformation d'un substrat S en présence de 3 substances M, N et P. On obtient les courbes N° 2, 3 et 4 respectivement.

2. *Déduire de ces courbes si M, N et P sont des activateurs ou des inhibiteurs. Justifiez.*

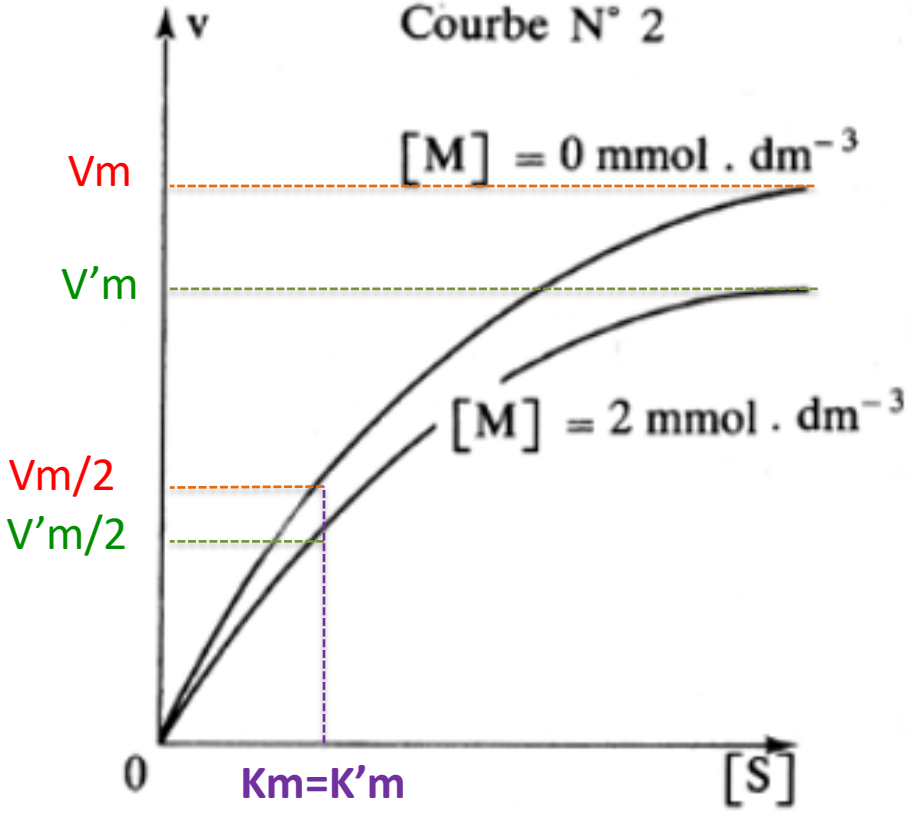


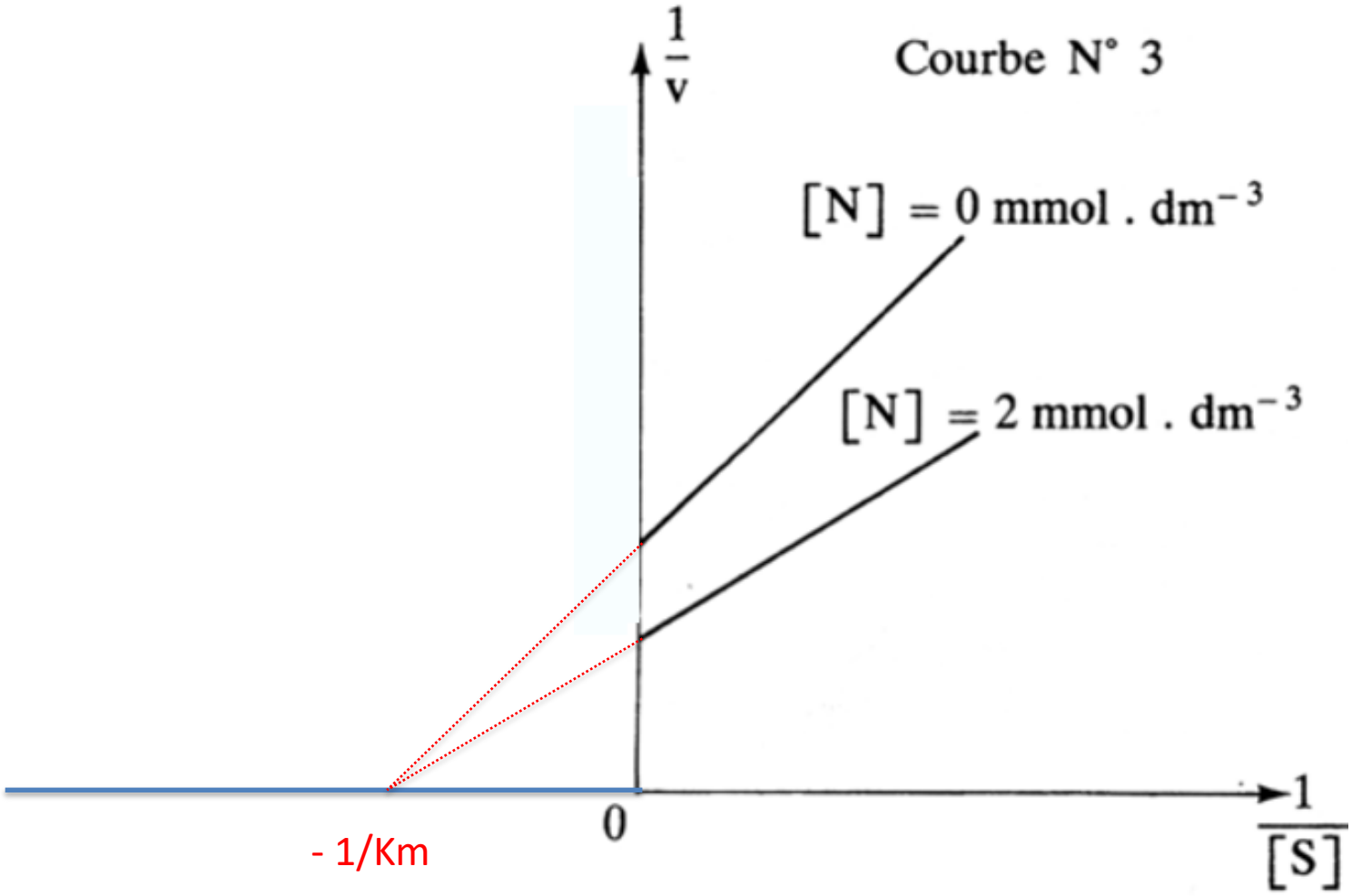
Exercice 3

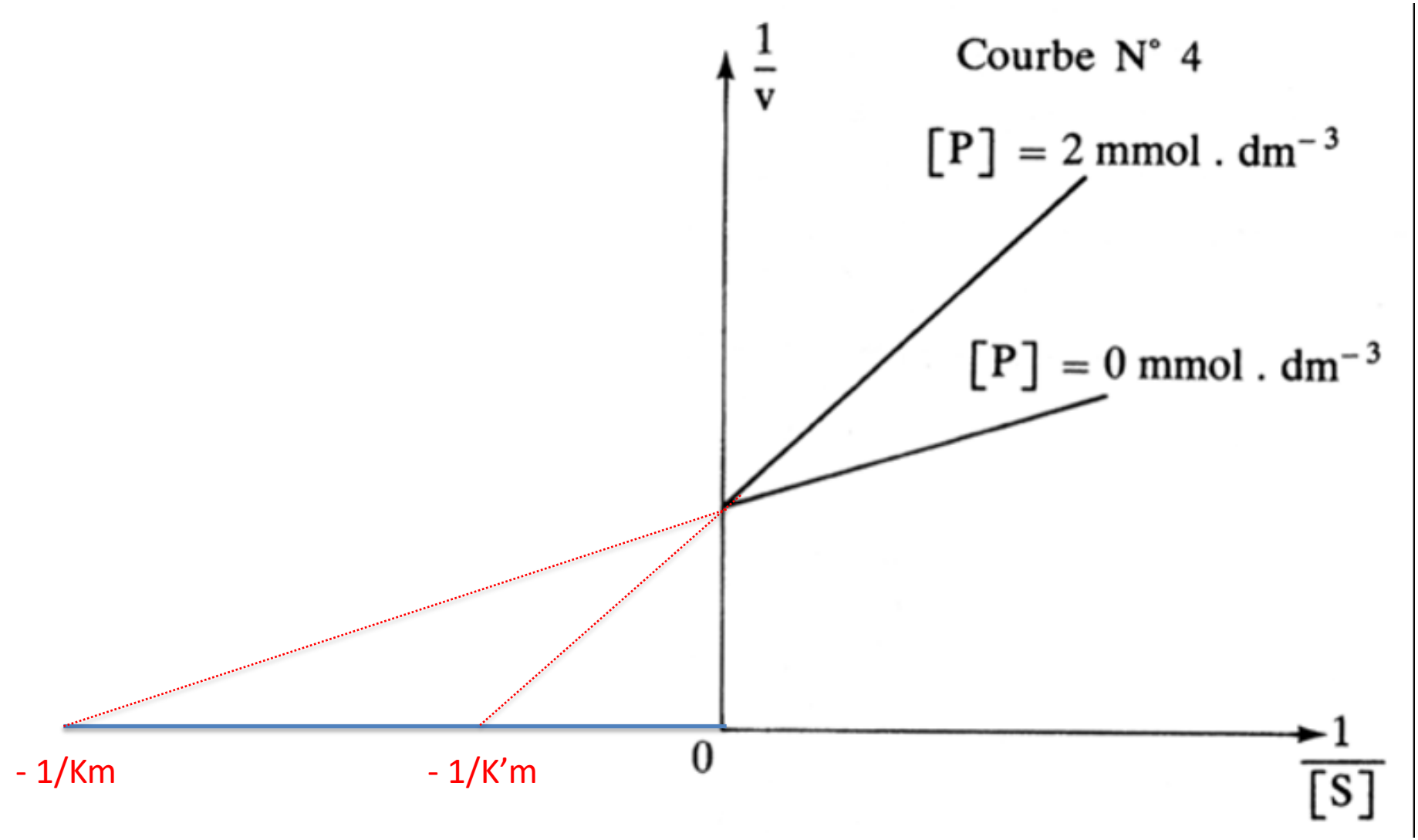
a : tableau résumé

	Vm ($mmol.min^{-1}$)	Vm/2 ($mmol.min^{-1}$)	Km ($mmol.dm^{-3}$)
Absence de F	0,42	0,21	1,5
Présence de F	0,16	0,08	1,5
Inhibition non compétitive	Affinité non modifiée et Vm 2,5 fois plus faible		

b : Courbe 2 : inhibition non compétitive (Vm augmente, Km ne varie pas) ; courbe 3 : activateur allostérique qui n ese fixe pas sur le site actif (1/Vm diminue donc Vm augmente mais -1/Km inchangé) ; courbe 4 : inhibition compétitive (1/Vm ne varie pas, pente plus faible donc -1/Km plus faible i.e Km plus grand donc affinité plus faible)




Courbe N° 3
1/v
[N] = 0 mmol . dm⁻³
[N] = 2 mmol . dm⁻³
0
- 1/Km
1/[S]


Courbe N° 4
1/v
[P] = 2 mmol . dm⁻³
[P] = 0 mmol . dm⁻³
0
1/[S]
- 1/Km
- 1/K'm

B. Etude de l'invertase : influence de la concentration en enzyme

L'invertase catalyse la réaction d'hydrolyse du saccharose : eau + saccharose = glucose + fructose.

On réalise une série d'expériences pour des concentrations croissantes en enzyme. Les autres conditions opératoires (T°C= 25 °C, pH, concentration initiale en substrat) sont les mêmes pour chaque essai. Chaque essai est réalisé en introduisant dans un tube :

- 1 cm^3 de solution d'enzyme de concentration molaire CE $mol.L^{-1}$;
- 1 cm^3 de solution tampon ;
- 1 cm^3 de solution de substrat en concentration saturante.

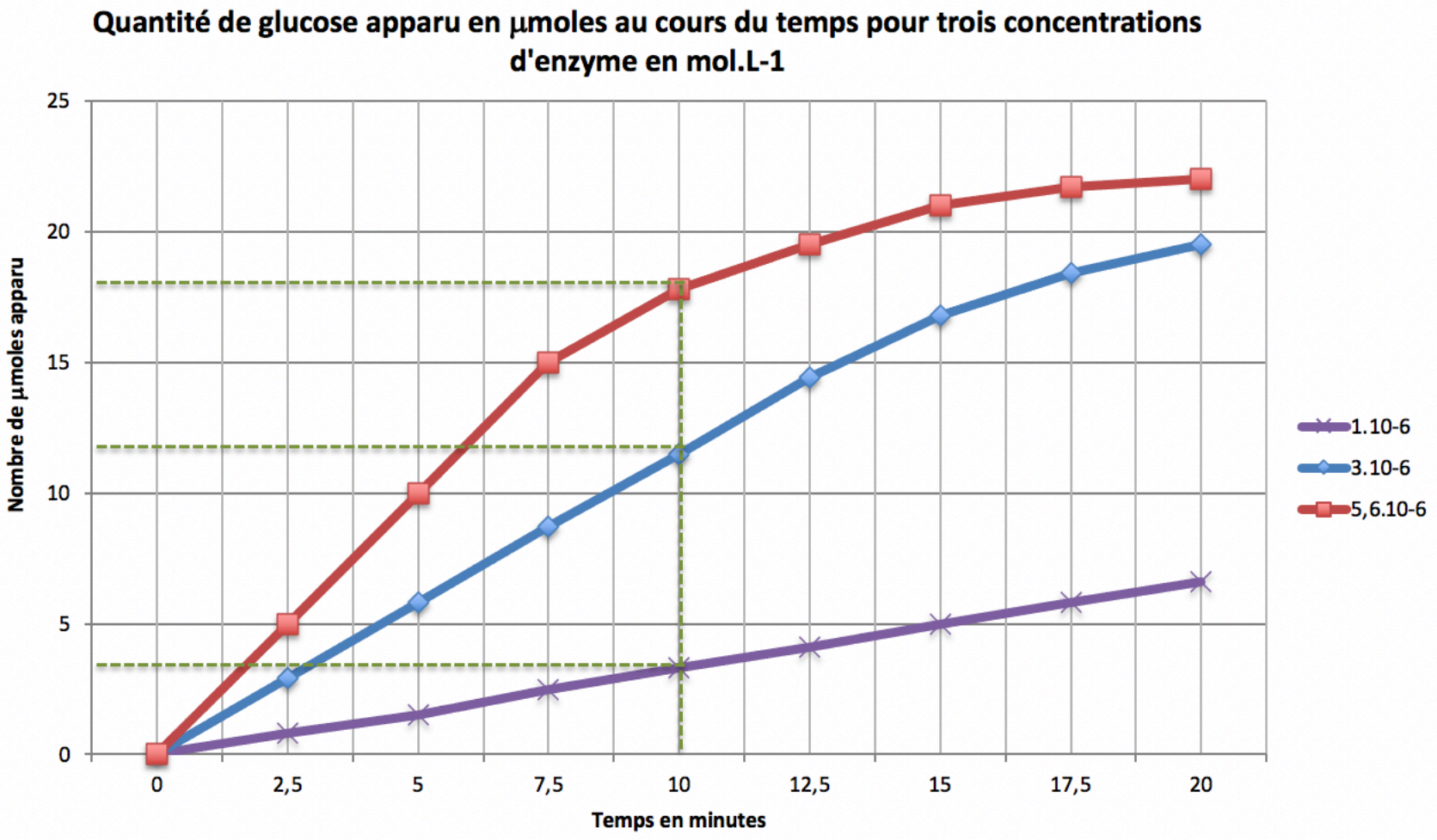
On dose le glucose apparu à intervalles de temps réguliers. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau page suivante.

CE = concentration d'enzyme en $mol.L^{-1}$	**P = nombre de µmoles de glucose apparu par tube**							
1. 10^{-6}	0,8	1,5	2,5	3,3	4,1	5,0	5,8	6,6
3,6. 10^{-6}	2,9	5,8	8,7	11,5	14,4	16,8	18,4	19,5
5.6. 10^{-6}	5,0	10,0	15,0	17,8	19,5	21,0	21,7	22,0
Temps en minutes	2,5	5	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0

a. *Tracez sur un même graphique les courbes représentatives de P = f(t) pour chacune des concentrations en enzyme. Commenter l'allure de ces courbes.*
b. *Déduisez des courbes précédentes la vitesse initiale V_i, de la réaction pour chacune des concentrations CE d'enzyme. La vitesse est exprimée en nombre de µmol de glucose apparu par tube et par minute.*
c. *Tracez la courbe représentative de V_i, = f(CE). Interpréter l'allure de la courbe.*
d. *L'unité d'invertase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 µmol de saccharose par minute à 25 °C. Sachant que la masse molaire de l'enzyme est égale à 250 000 $g.mol^{-1}$, calculer **l'activité spécifique*** de l'enzyme.*

** L'activité spécifique est la **quantité de substrat transformé par unité de temps et par masse de protéine** = l'activité enzymatique ramenée à une masse de protéine. L'activité spécifique est exprimée en $UI.mgE^{-1}$.*

Une UI (Unité Internationale) est le nombre de µmol de P formé ou de S transformé par min.



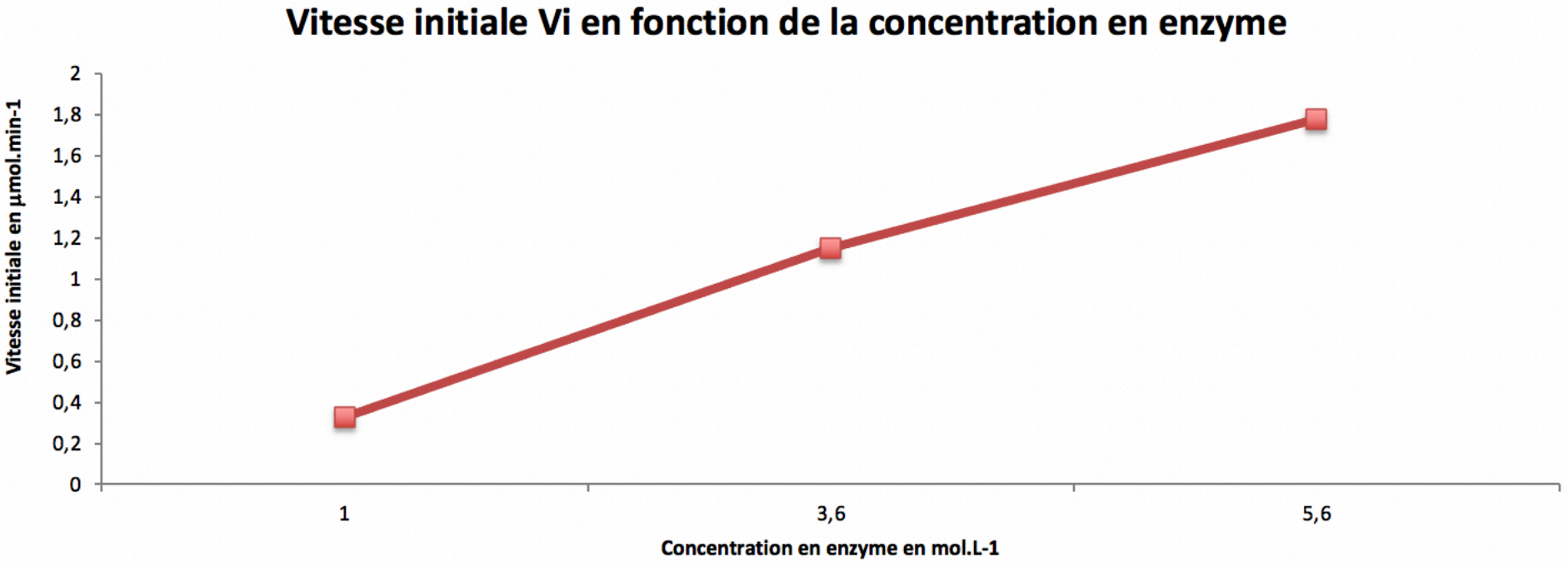
1.b : La Vi pour chaque concentration en substrat est donnée par la pente de la tangente à l'origine, c'est-à-dire la pente de la partie linéaire de la courbe (conditions initiales).

On divise les valeurs lues par 10 pour ramener à 1 minute

CE = 1.10^{-6} mol. L^{-1}, Vi = 0,33 µmol de glucose. min^{-1} par tube.

CE = $3,6. 10^{-6}$ mol. L^{-1}, Vi = 1,15 µmol de glucose. min^{-1} par tube.

CE = $5,6. 10^{-6}$ mol. L^{-1}, Vi= 1,78 µmol de glucose. min^{-1} par tube.

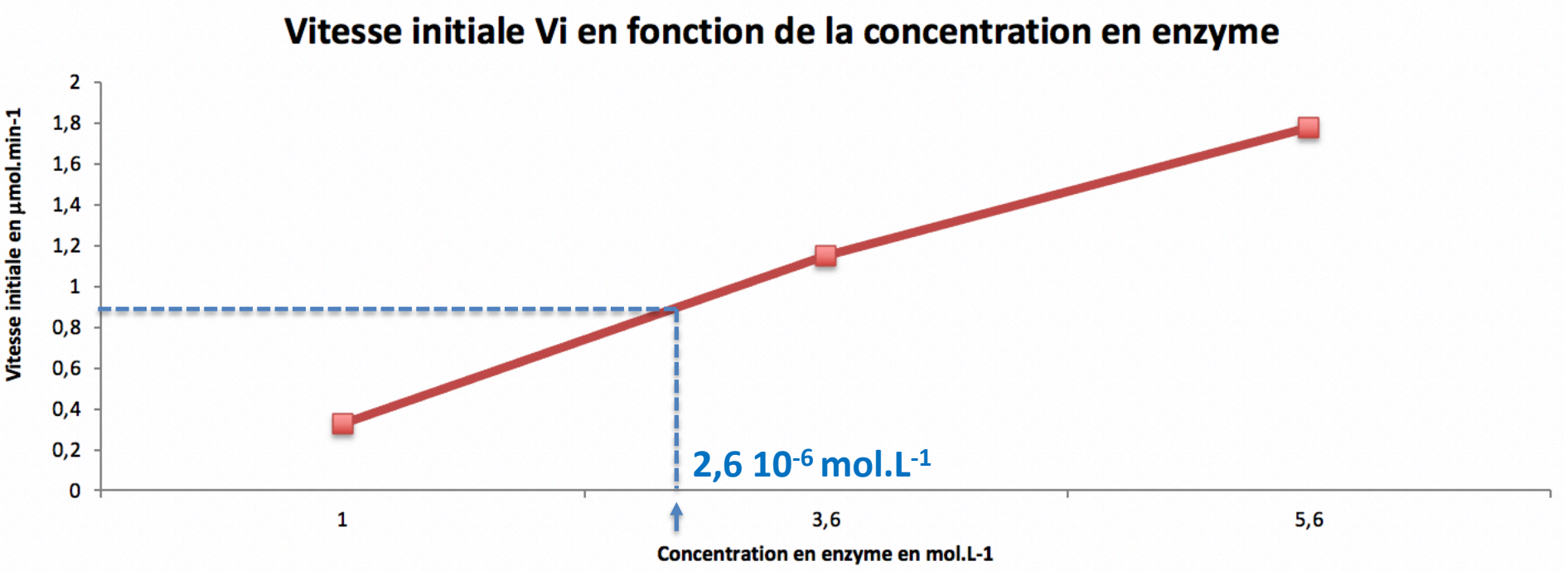


1.c : Les valeurs précédemment obtenues permettent de tracer la courbe représentative de Vi= f(CE). On obtient une droite. En effet tant que la concentration en substrat est saturante, la Vi de la réaction enzymatique ne dépend que de la concentration en enzyme: Vi =Vmax [S]/ Km + [S] or [S] >>> Km, donc Vi = Vmax qui est fonction de CE.

1.d : L'activité spécifique peut se calculer à partir de l'une des concentrations en enzyme CE, par exemple $5,6.10^{-6}$ mol. L^{-1}, c'est-à-dire $5,6.10^{-6}$ x 250000 = 1,4 mg. L^{-1}.
La masse d'enzyme utilisée dans le test est de 1,4 mg pour produire 1,78 µmol de glucose. L'activité spécifique est donc de 1,78/1,4 = 1,27 UI. mg^{-1}.
Avec les autres valeurs de [E], on trouve 1,32 et 1,28 UI. mg^{-1}.

1.e : Activité de 1 ml d'extrait: 3,6/4 = 0,9 UI. ml^{-1}.
300 mg d'enzyme pour 100 mL soit 3 $g.L^{-1}$ d'enzyme
Concentration molaire en enzyme: 3 $g.L^{-1}$ /250 000 $g.mol^{-1}$ = 12. 10^{-6} mol. L^{-1}.

Sur la courbe V = f(CE), on a une concentration en enzyme égale à 2,6.10^{-6} mol.L^{-1} pour une activité de 0,9 UI. ml^{-1}.

La masse en enzyme pure est 2,6.10^{-6}.250000/10 = 6,5.10^{-2} g ou 65 mg. Le pourcentage en enzyme pure est donc de [65/300] x 100 = 21,7 %.

On divise par 10 car on travaille sur 100 mL soit 1/10e de litre