

## 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:



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 <sup>-1</sup>	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

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

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.

1. *Sachant que la masse molaire du glucose est de  $180 \text{ g.mol}^{-1}$  et que la glycémie des mammifères est d'environ  $0,9 \text{ g. L}^{-1}$ , 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)	$0,4 \text{ mM. L}^{-1}$	Constant	Diminué
Glucokinase (GK)	$65 \text{ mM. L}^{-1}$	Augmenté	Constante

2. *Interprétez les résultats obtenus.*
  - a. *Quel intérêt biologique pour la cellule présente le phénomène mis en évidence ?*

## 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.  $K_m$  est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à  $V_m/2$ . Pour HK,  $k_m = 0,05 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$  et pour GK,  $k_m = 15 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ . HK est donc environ 300 fois plus affine pour le glucose que GK.

c. Une glycémie de  $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  représente  $0,9/180$  soit  $5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ . Le  $K_m$  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  $k_m$  de GK est 3 fois plus élevé que la concentration hépatique de glucose. L'enzyme travaille donc toujours à proximité de sa vitesse 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 :

1. 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 cinétique de l'invertase

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

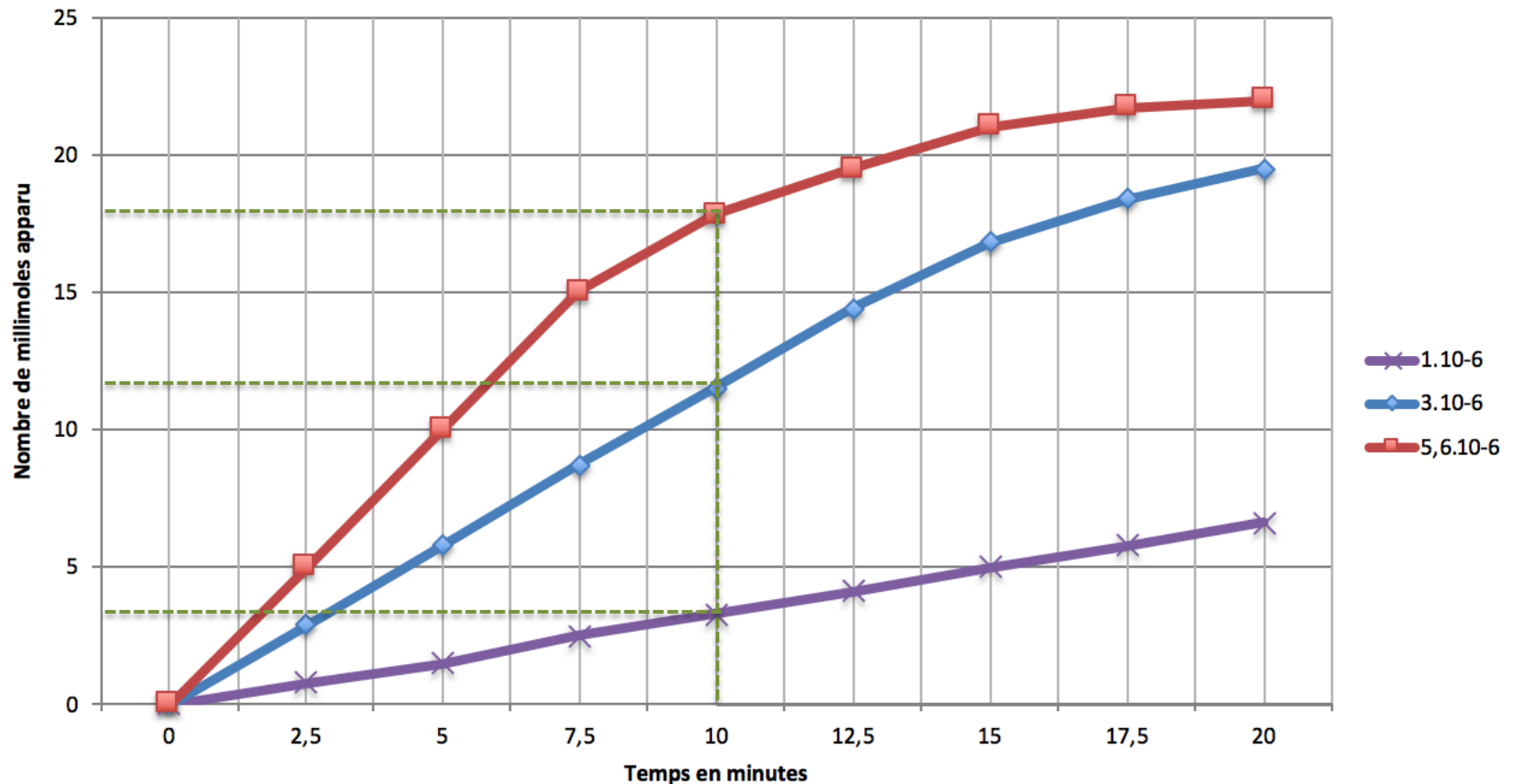
On réalise une série d'expériences pour des concentrations croissantes en enzyme. Les autres conditions opératoires ( $T^{\circ}\text{C}= 25^{\circ}\text{C}$ , pH, concentration initiale en substrat) sont les mêmes pour chaque essai. Chaque essai est réalisé en introduisant dans un tube:

1.  $1\text{ cm}^3$  de solution d'enzyme de concentration molaire  $\text{CE mol.L}^{-1}$ ;
2.  $1\text{ cm}^3$  de solution tampon;
3.  $1\text{ cm}^3$  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 suivant.

<b>CE = concentration d'enzyme en mol.L<sup>-1</sup></b>	<b>P = nombre de mmoles de glucose apparu par tube</b>							
<b><math>1 \cdot 10^{-6}</math></b>	0,8	1,5	2,5	3,3	4,1	5,0	5,8	6,6
<b><math>3,6 \cdot 10^{-6}</math></b>	2,9	5,8	8,7	11,5	14,4	16,8	18,4	19,5
<b><math>5,6 \cdot 10^{-6}</math></b>	5,0	10,0	15,0	17,8	19,5	21,0	21,7	22,0
<b>Temps en minutes</b>	2,5	5	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0

## Quantité de glucose apparu au cours du temps pour trois concentrations d'enzyme en mol.L-1



1.b : La  $V_i$  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).

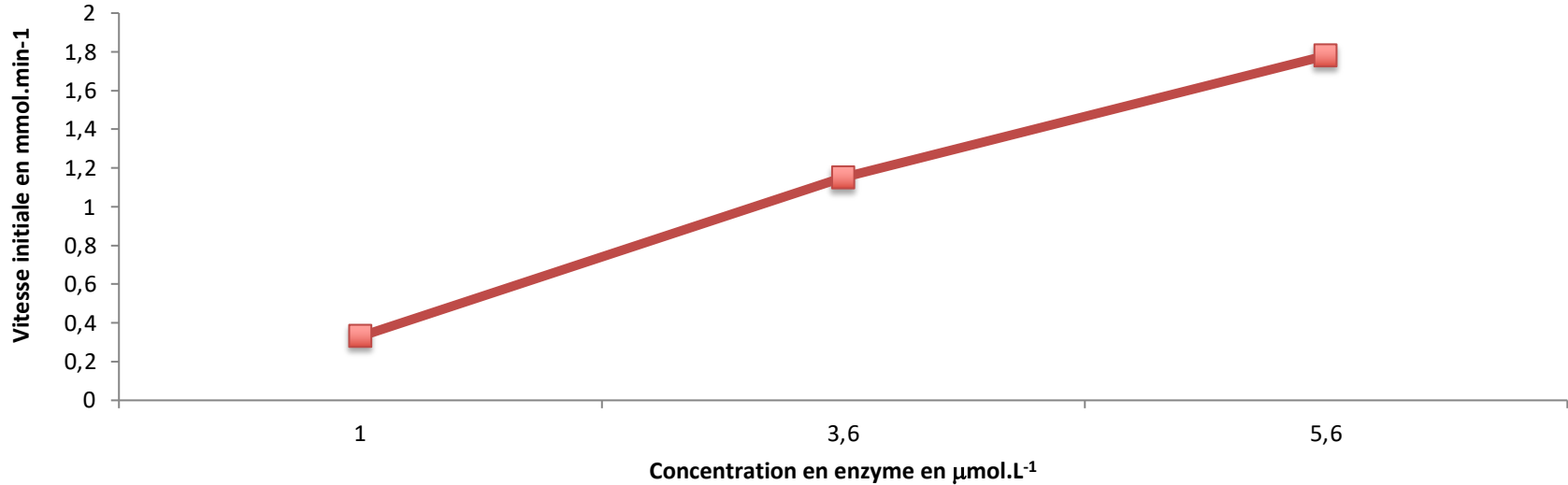
On divise les valeurs lues par 10 pour ramener à 1 minute

CE =  $1 \cdot 10^{-6}$  mol. L<sup>-1</sup>,  $V_i = 0,33$  mmol de glucose . min<sup>-1</sup> par tube.

CE =  $3,6 \cdot 10^{-6}$  mol. L<sup>-1</sup>,  $V_i = 1,15$  mmol de glucose . min<sup>-1</sup> par tube.

CE =  $5,6 \cdot 10^{-6}$  mol. L<sup>-1</sup>,  $V_i = 1,78$  mmol de glucose .min<sup>-1</sup> par tube.

## Vitesse initiale $V_i$ en fonction de la concentration en enzyme



1.c : Les valeurs précédemment obtenues permettent de tracer la courbe représentative de  $V_i = f(CE)$ . On obtient une droite. En effet tant que la concentration en substrat est saturante, la  $V_i$  de la réaction enzymatique ne dépend que de la concentration en enzyme:  $V_i = V_{\text{max}} [S] / K_m + [S]$  or  $[S] \gg K_m$ , donc  $V_i = V_{\text{max}}$  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  $5,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$ , c'est-à-dire  $5,6 \cdot 10^{-6} \times 250000 = 1,4 \text{ mg. L}^{-1}$ .  
La masse d'enzyme utilisée dans le test est de 1,4 mg pour produire 1,78 mmol de glucose. L'activité spécifique est donc de  $1,78 / 1,4 = 1,27 \text{ UI. mg}^{-1}$ .  
Avec les autres valeurs de  $[E]$ , on trouve 1,32 et  $1,28 \text{ UI. mg}^{-1}$ .

1.e : Activité de 1 ml d'extrait:  $3,6/4 = 0,9$  UI. ml<sup>-1</sup>.

300 mg d'enzyme pour 100 mL soit  $3$  g.L<sup>-1</sup> d'enzyme

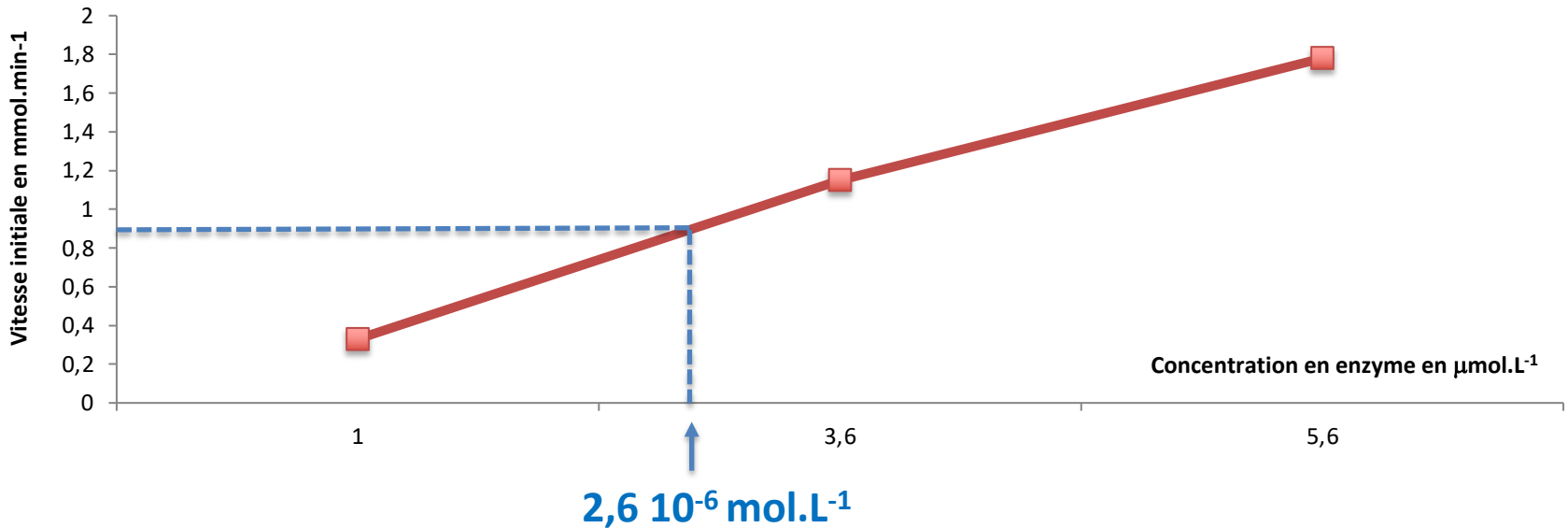
Concentration molaire en enzyme:  $3$  g.L<sup>-1</sup> /  $250\ 000$  g.mol<sup>-1</sup> =  $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol. L<sup>-1</sup>.

Sur la courbe  $V = f(CE)$ , on a une concentration en enzyme égale à  $2,6 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> pour une activité de  $0,9$ UI. ml<sup>-1</sup>.

La masse en enzyme pure est  $2,6 \cdot 10^{-6} \cdot 250000 / 10 = 6,5 \cdot 10^{-2}$  g ou 65 mg. Le pourcentage en enzyme pure est

$$65.100/300 = 21,7 \%$$

### Vitesse initiale Vi en fonction de la concentration en enzyme



### 3. La cinétique enzymatique

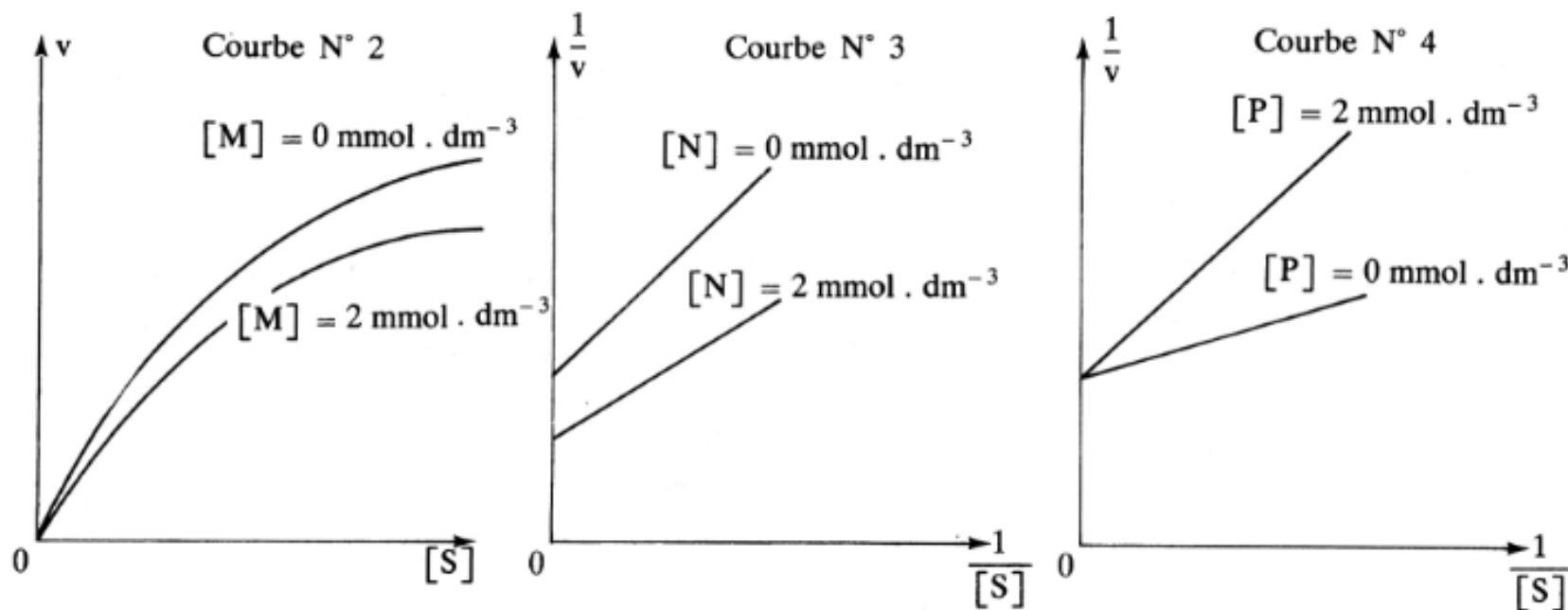
Le tableau ci-dessous traduit la cinétique de la transformation d'un substrat S en l'absence et en présence d'une substance F.

[S] en mmol.dm <sup>-3</sup>	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.



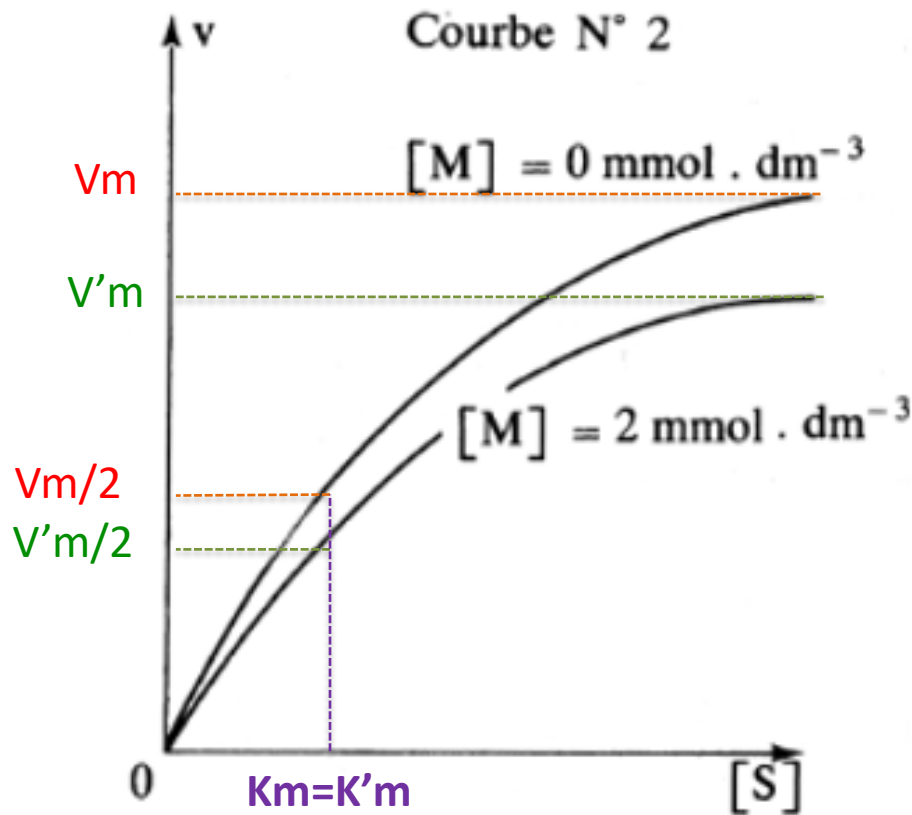


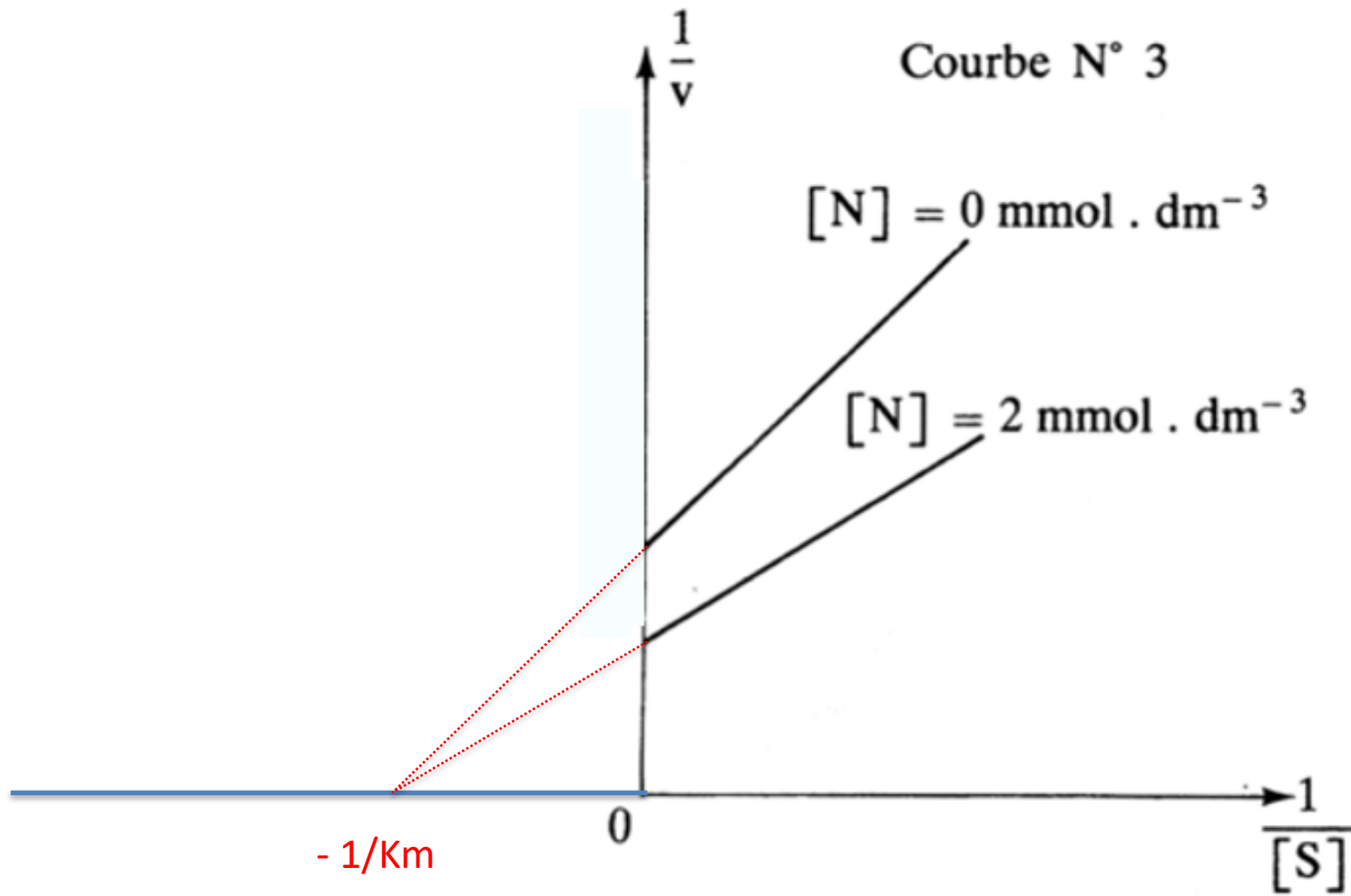
### Exercice 3

a : tableau résumé

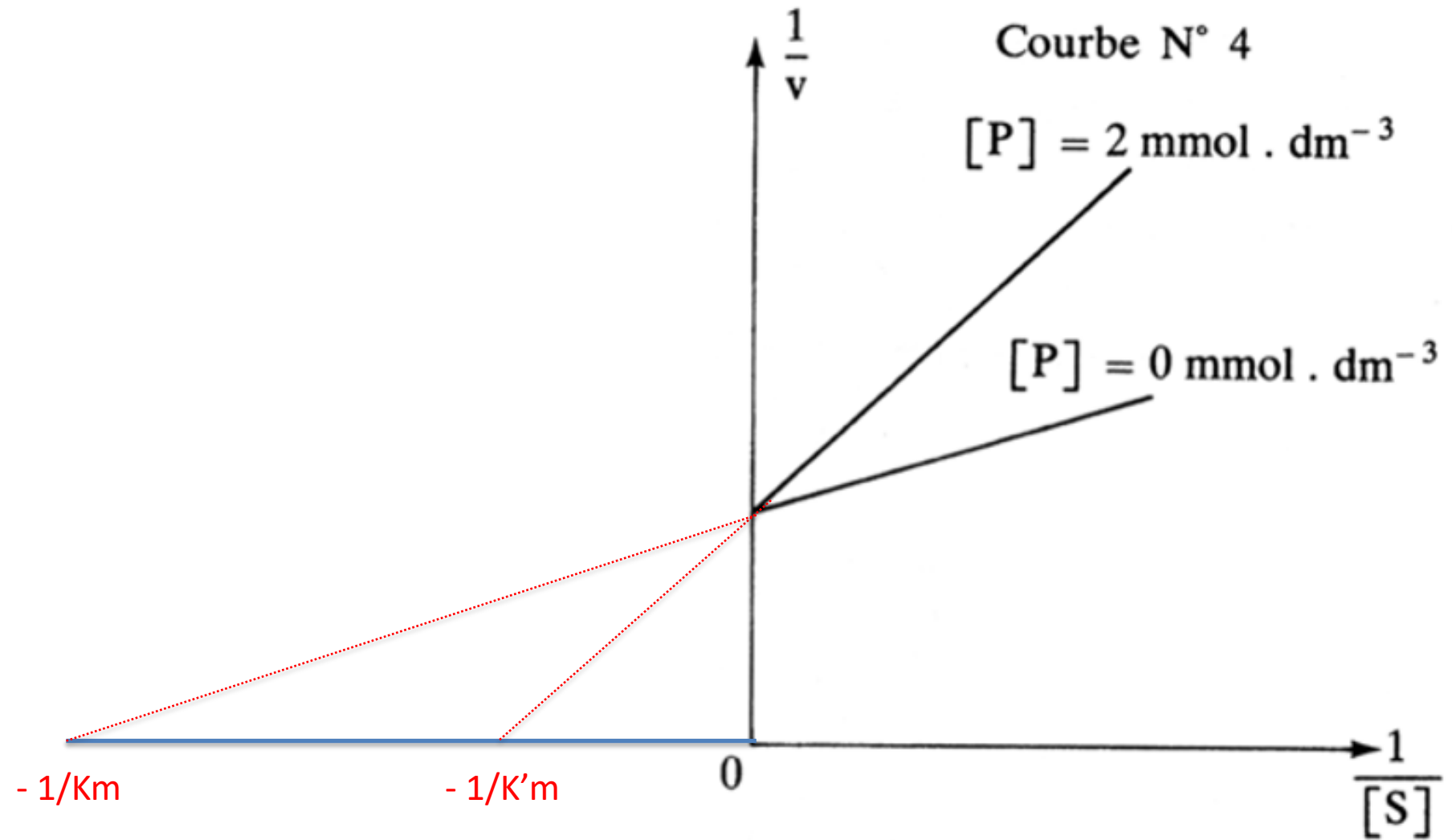
	$V_m$ (mmol.min <sup>-1</sup> )	$V_m/2$ (mmol.min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mmol.dm <sup>-3</sup> )
<b>Absence de F</b>	0,42	0,21	1,5
<b>Présence de F</b>	0,16	0,08	1,5
<b>Inhibition non compétitive</b>	Affinité non modifiée et $V_m$ 2,5 fois plus faible		

b : Courbe 2 : inhibition non compétitive ( $V_m$  augmente,  $K_m$  ne varie pas) ;





courbe 3 : activateur allostérique qui ne se fixe pas sur le site actif ( $1/V_m$  diminue donc  $V_m$  augmente mais  $-1/K_m$  inchangé)



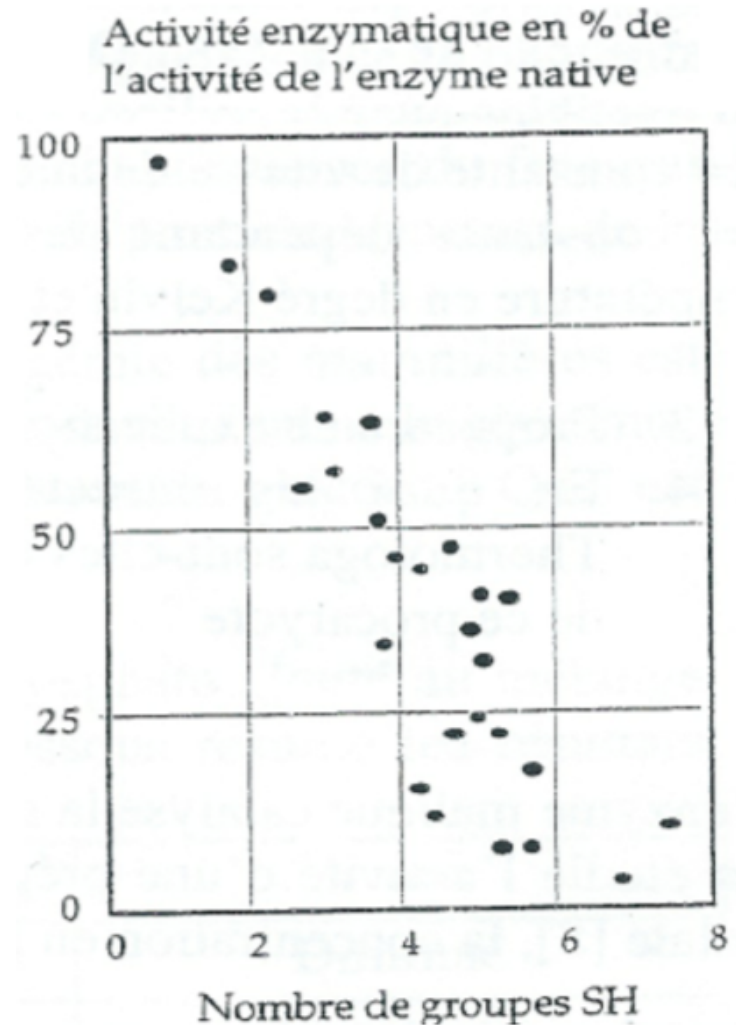
courbe 4 : inhibition compétitive ( $1/V_m$  ne varie pas, pente plus faible donc  $-1/K_m$  plus faible i.e  $K_m$  plus grand donc affinité plus faible)

## Exercice 4

Anfinsen et son équipe ont dénaturé la ribonucléase bovine, enzyme qui possède 4 ponts disulfures. Ils ont mesuré l'activité enzymatique de l'enzyme puis l'ont dénaturé en rompant les ponts disulfures. Ils l'ont ensuite renaturée et ont mesuré son activité durant la renaturation. Cette activité est exprimée en % de l'activité de l'enzyme native (in Cooper, la cellule, une approche moléculaire, 1999).

*Exploitez les résultats obtenus*

L'activité est une fonction décroissante du nombre de groupes sulfhydriles (SH). Plus leur nombre augmente, plus il y a de ponts disulfures rompus puisque le soufre est réduit. Les ponts S-S sont des liaisons covalentes qui participent à la structure tertiaire des protéines. Plus ces liaisons sont détruites, plus la conformation spatiale est modifiée entraînant une perte de fonction. Le caractère progressif de cette dernière montre qu'il n'y a pas de « loi du tout ou rien » : le changement partiel de conformation autorise toujours une certaine activité enzymatique suggérant ainsi que le site actif est modérément affecté lorsque peu de liaisons sont rompues.



## Exercice 5 : Le parfum des roses et l'enzyme OMT

On s'intéresse ici aux roses à odeur de thé, hybrides entre des variétés européennes et chinoises. L'étude porte sur l'enzyme OMT (Orcinol O-Methyl Transférase).

La **figure 1** résume l'histoire génétique de cette variété (A) et indique la voie de biosynthèse du DMT (B), molécule responsable de leur odeur.

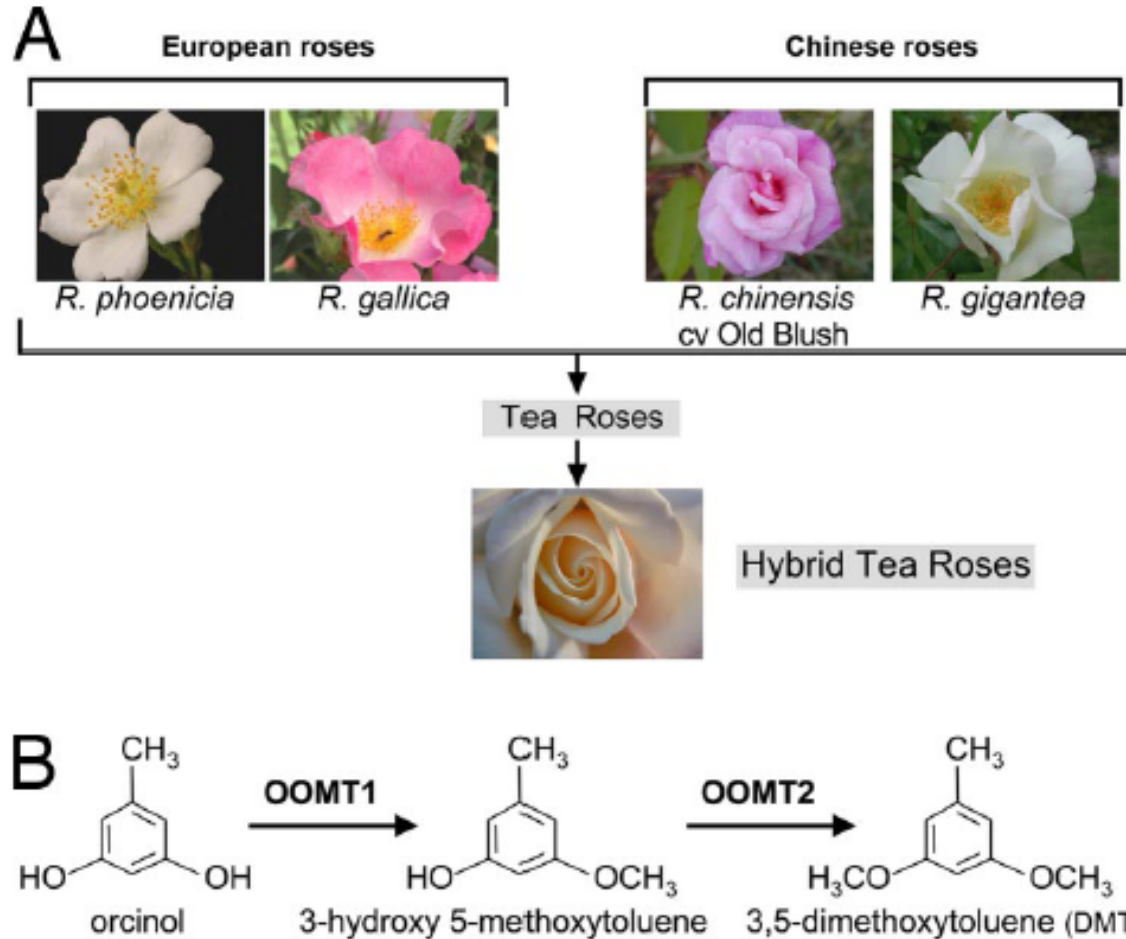


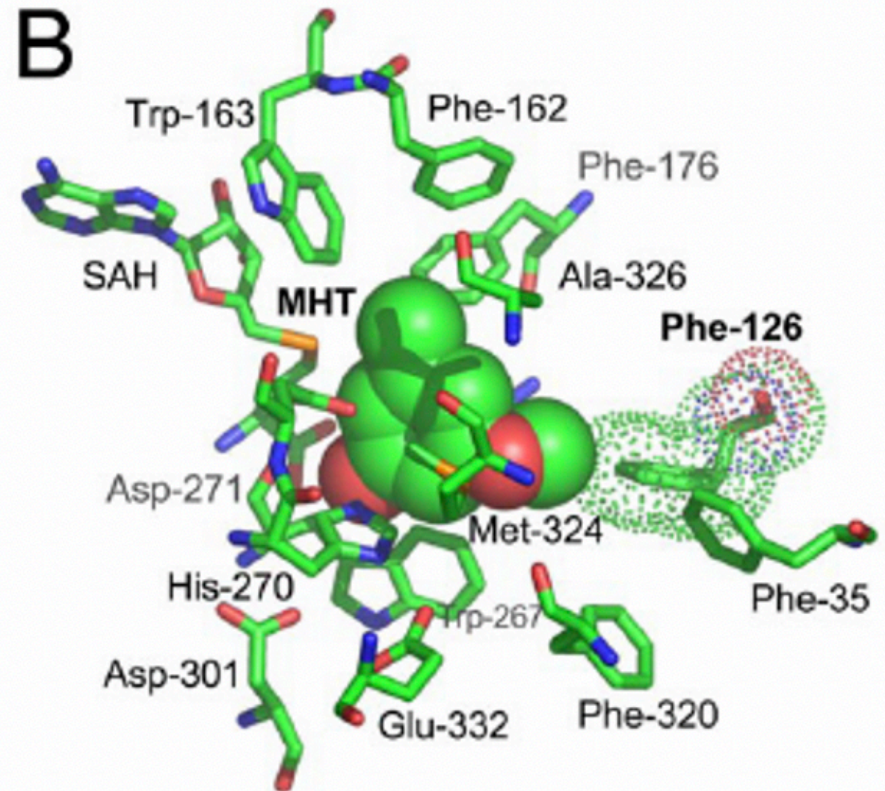
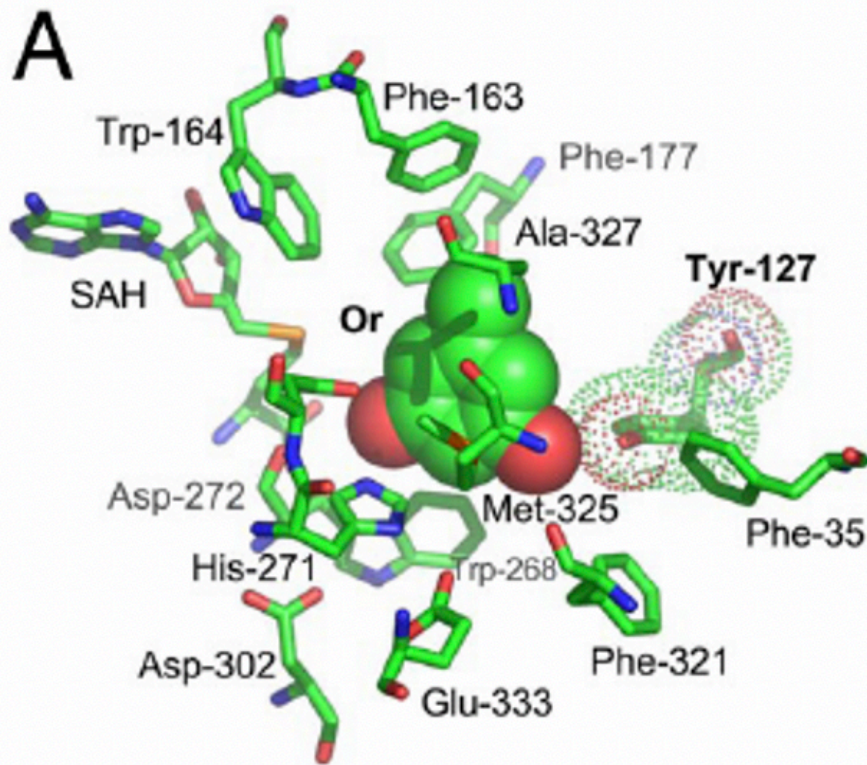
Figure 1 : Généalogie des roses à odeur de thé (A) et voie de biosynthèse du DMT (B)

Les modèles moléculaires du site actif des enzymes OMT1 et OMT2 ont été établis. Ils révèlent l'importance de deux acides aminés, la phénylalanine en position 126 (Phe-26) et la tyrosine en position 127 (Tyr-17)

Des expériences de mutagenèse dirigée ont généré deux mutants notés OMT1 et OMT2 sur lesquels des tests de spécificité de substrat sont réalisés.

Chez le mutant OMT1, la phénylalanine en position 126 est remplacée par la tyrosine (notation F126Y).

Chez le mutant OMT2, la tyrosine en position 127 est remplacée par la phénylalanine (notation Y127F).

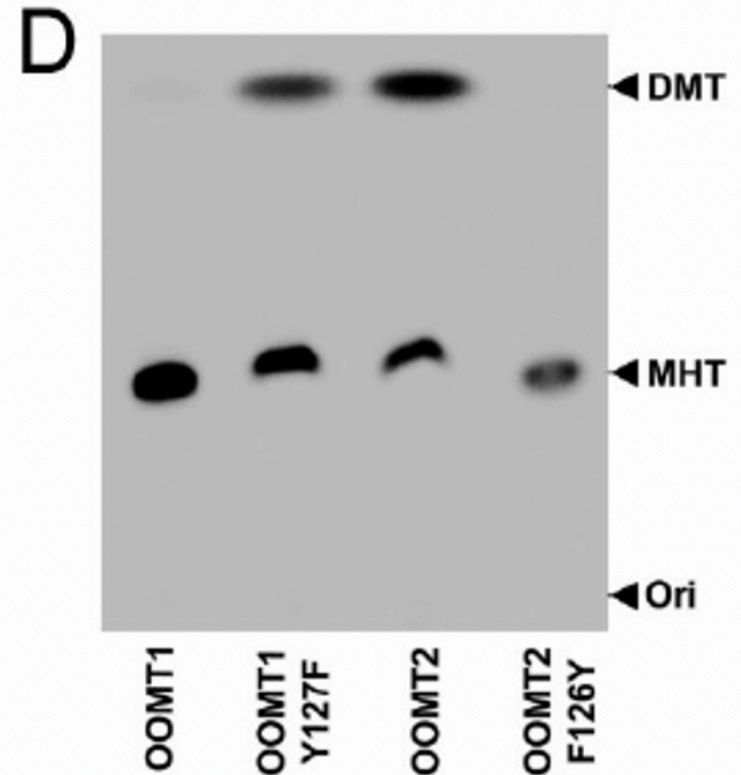
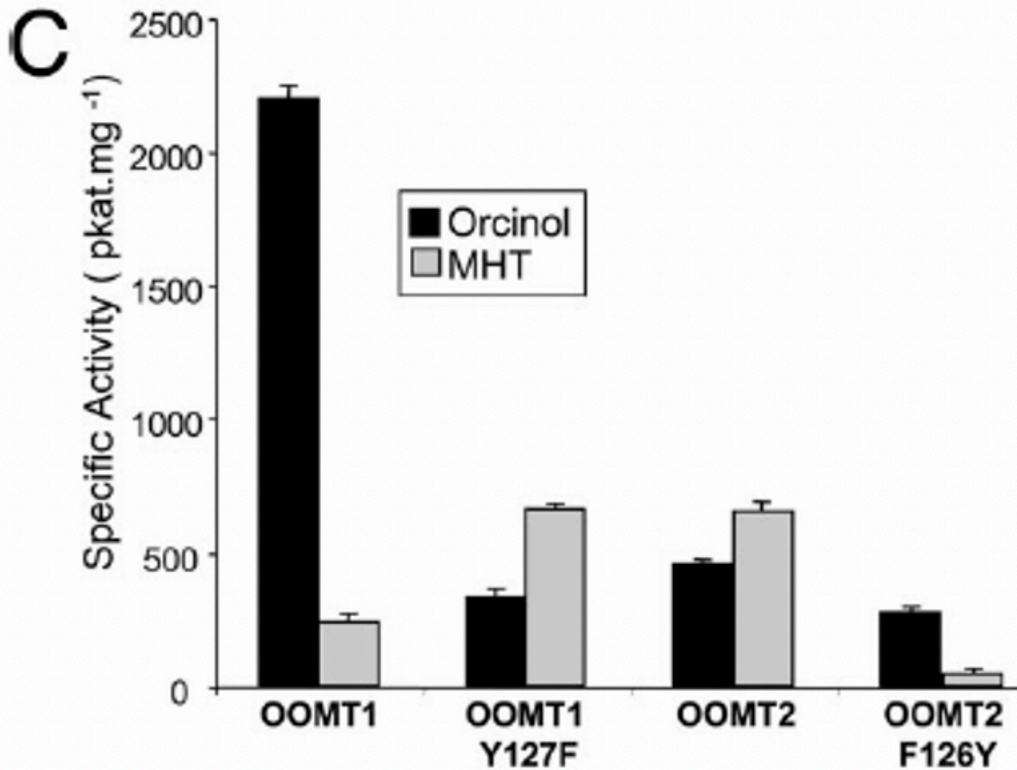




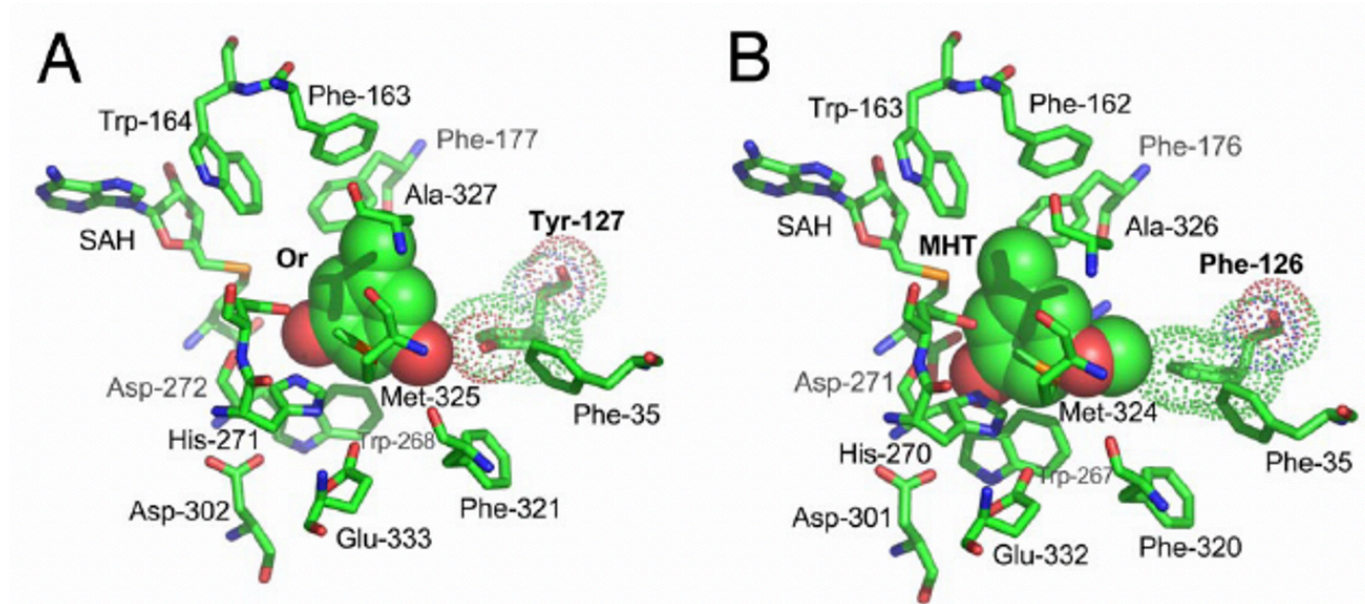
**La figure 2** donne le résultat des tests de spécificité de substrat des mutants OMT (C et D).

En C, l'activité spécifique est mesurée en présence de 500  $\mu\text{M}$  d'orcinol (barres noires) ou de MHT (barres grises).

En D, le western-blot est réalisé après incubation de l'enzyme native et mutante avec 200  $\mu\text{M}$  d'orcinol et en présence 50  $\mu\text{M}$  de S-adénosyl-L-[Methyl- $^{14}\text{C}$ ] méthionine. La position de l'origine (Ori) et des produits des réactions MHT et DMT sont indiquées.



1. Comment appelle-t-on les représentations A et B de la figure 1 ? Comment sont-elles obtenues ?
2. Comparez les figures A et B.



1. Il s'agit de modèles moléculaires établis bio-informatiquement à partir de la connaissance de la séquences d'acides aminés de la protéine. Des logiciels comme Pymol, Rastop, Rasmol... permettent de les visualiser. Une représentation de type compact dans lequel chaque atome est représenté par une sphère ou de type fil de fer représente le squelette de la molécule.
2. Les substrats (Or en A et MHT en B) sont représentés selon la représentation « boule » tandis que l'enzyme est dessinée sous forme de bâtonnets qui visualisent les liaisons atomiques. La forme générale de OMT1 et OMT2 est la même mais le site actif diffère notamment au niveau de Tyr-127 et Phe-126.



Obtention de cristaux

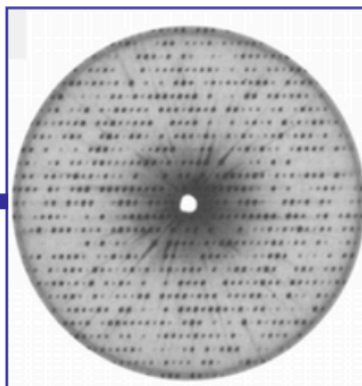


Cristallisation de Protéine purifiée

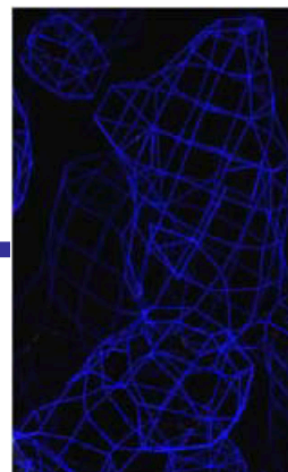
Diffractomètre Rayons X



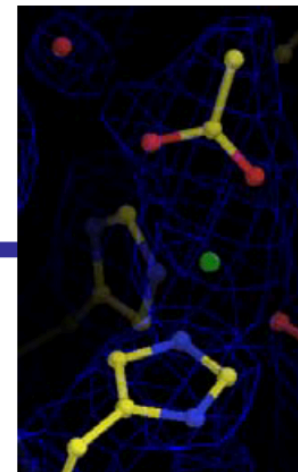
Cliché de diffraction



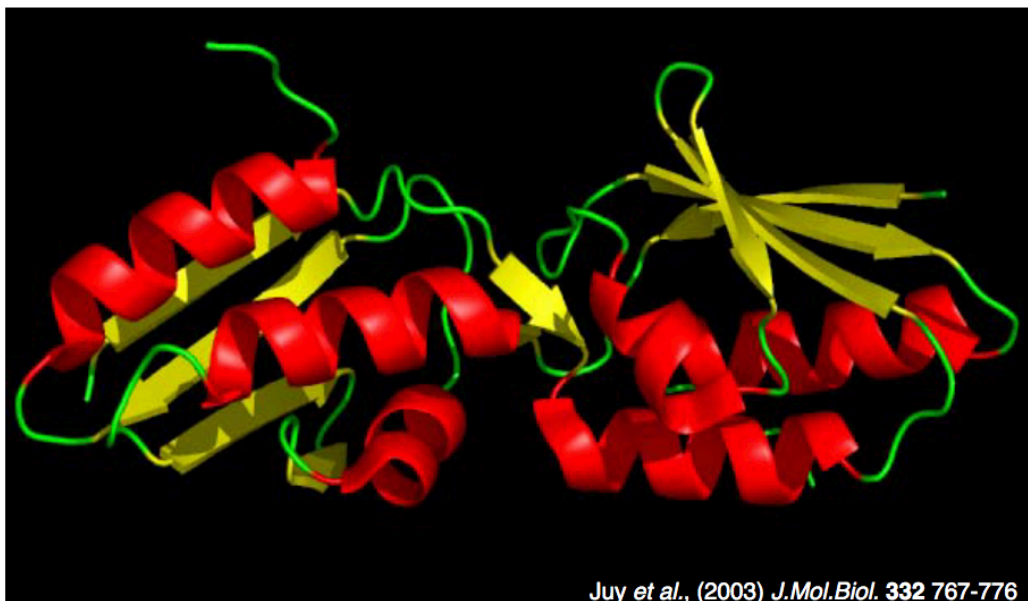
Densité électronique



Optimisation



**Modélisation moléculaire**



Juy *et al.*, (2003) *J.Mol.Biol.* **332** 767-776

Structure 3D

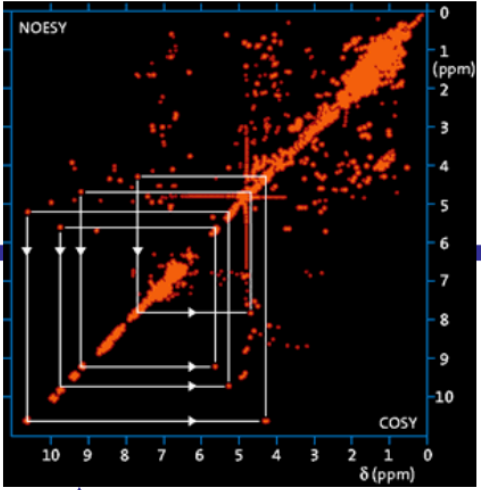
Biocristallographie : Equipe de R. Haser (IBCP)

Spectromètre RMN à haut champ (ici 500 MHz)

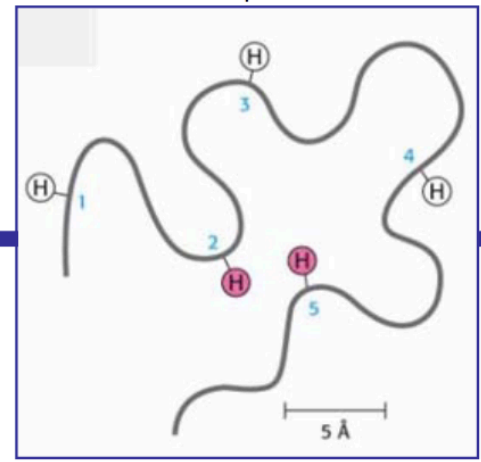


Protéine purifiée en solution très concentrée

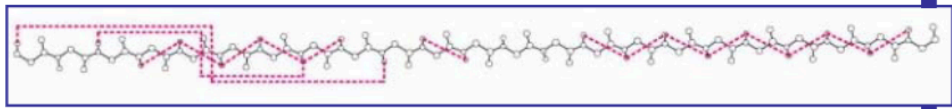
Spectres 2D NOESY TOCSY



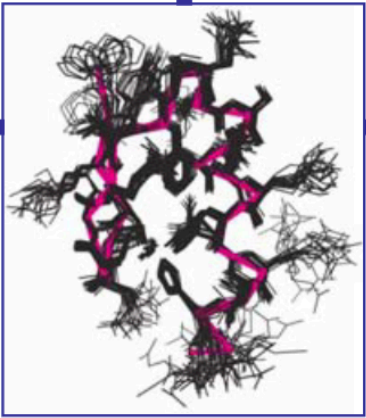
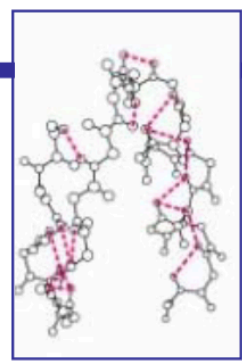
Proximités spatiales



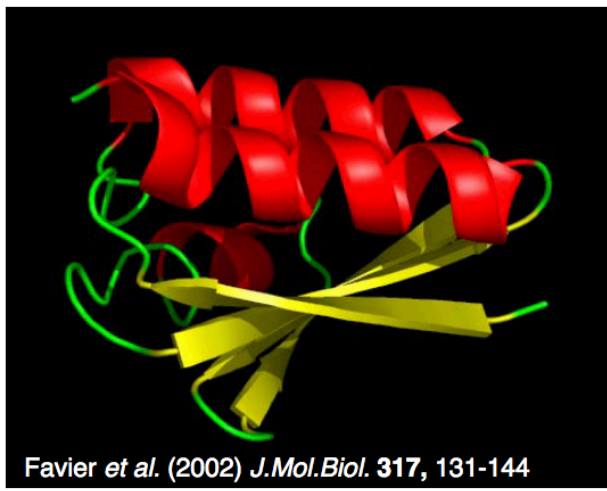
Attribution



## Modélisation moléculaire



«Fagot» de structures



Favier et al. (2002) *J.Mol.Biol.* 317, 131-144

### 3. Définissez les caractéristiques d'un site actif.

Site actif = région fonctionnelle qui "accueille" le substrat et assure sa transformation. Il présente un site de positionnement et un site catalytique.

Microenvironnement d'où l'eau est exclue : il occupe une part relativement réduite du volume total d'une enzyme, généralement en profondeur, environnement généralement hydrophobe. Cette exclusion est une condition nécessaire à la catalyse enzymatique puisque l'eau est un solvant polaire qui se comporte comme un corps diélectrique. Or la force d'attraction  $F$  qui s'exerce entre deux charges  $d^+$  et  $d^-$  est donnée par la loi de Coulomb :  $F = \frac{d^+ \cdot d^-}{R^2 K}$ .

Ainsi la présence de l'eau affaiblit les forces entre les atomes constitutifs des molécules d'enzyme et de substrat.

#### Des forces d'interaction faibles

Les substrats sont reliés aux enzymes par des forces relativement faibles. Il s'agit le plus souvent de liaisons H dont le caractère directionnel permet un haut degré de spécificité entre l'enzyme et son substrat.

## Un nombre limité de résidus impliqués dans la reconnaissance

Il est fréquent que la fixation et la catalyse reposent sur cinq ou six résidus.

La comparaison de la structure primaire de quelques protéases à sérine au voisinage du site actif montre que l'environnement immédiat de la sérine est très bien conservé c'est à dire que l'on trouve la même séquence d'acides aminés.

## Une complémentarité stéréospécifique

La spécificité de liaison dépend de la disposition très précisément définie des atomes dans un site actif. Le modèle de l'ajustement induit de KOSHLAND indique que le site actif acquiert la forme complémentaire du substrat seulement après que celui-ci soit lié. Il s'agit alors d'un processus de reconnaissance dynamique au cours duquel enzyme et substrat adaptent réciproquement leurs formes. Ce modèle est appelé « poignée de main » de façon imagée.

#### 4. Qu'est-ce que l'activité spécifique d'une enzyme ?

Elle représente la vitesse maximale de catalyse enzymatique ramenée à la masse d'enzyme utilisée.

C'est le nombre de molécules de substrat transformées par minute et par mg d'enzymes  $AS = \mu\text{mol}/\text{min} / \text{mg de protéine} = \text{UI} / \text{mg de protéines}$ .

Elle mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

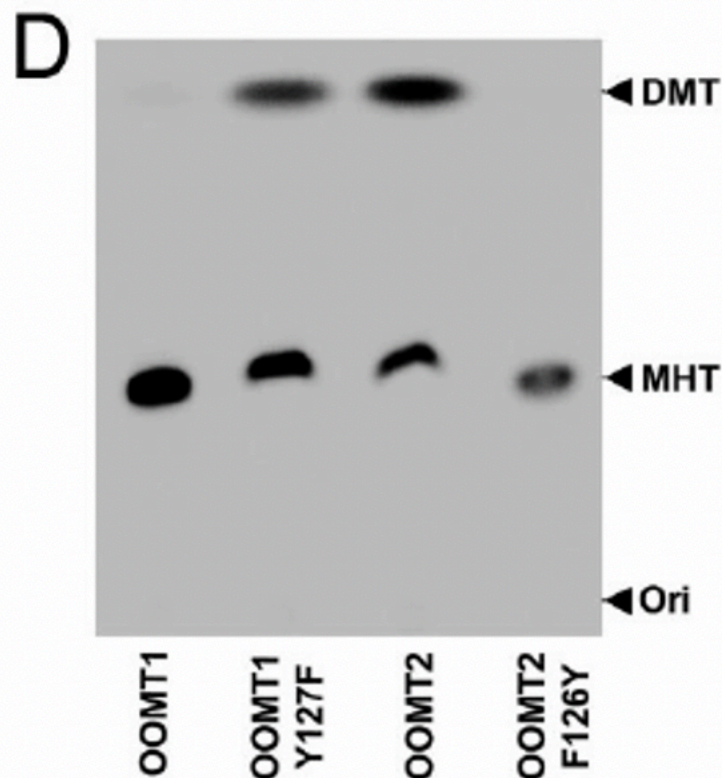
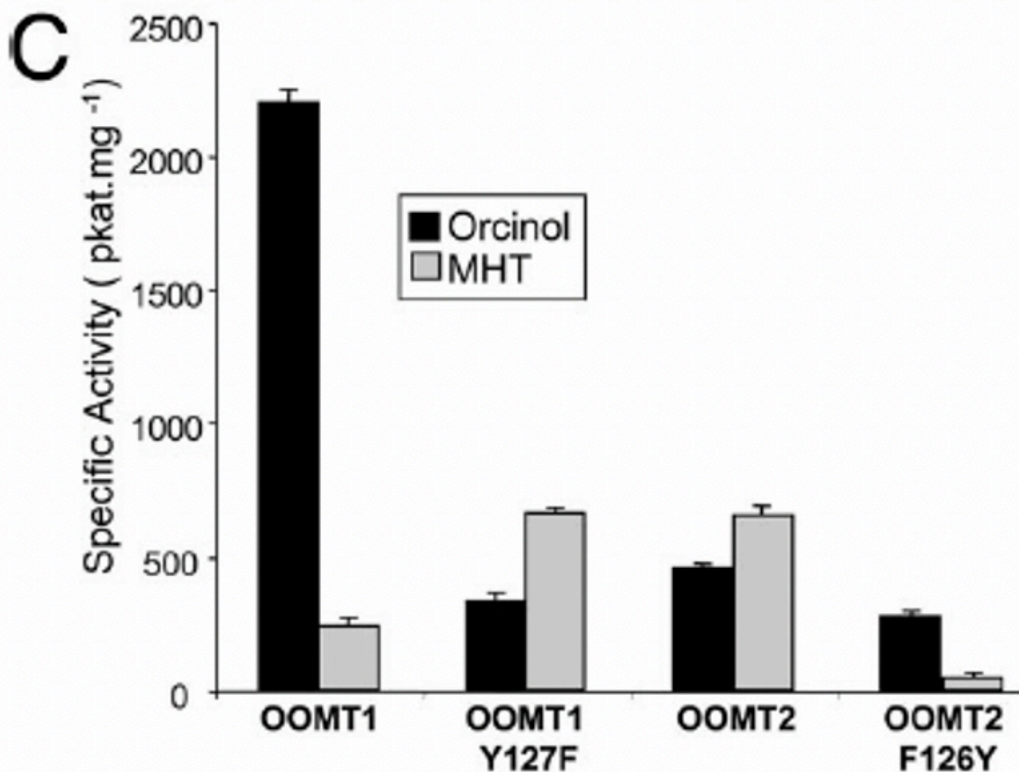
Remarque : L'unité officielle d'activité enzymatique est le katal (kat), quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde. Le katal n'est jamais utilisé, car beaucoup trop grand. On général on utilise le  $\mu\text{kat}$  ( $10^{-6}$  katal). La plupart des biochimistes préfèrent l'unité internationale (UI), qui est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1  $\mu\text{mole}$  de substrat par minute. 60 IU valent donc 1  $\mu\text{kat}$ .

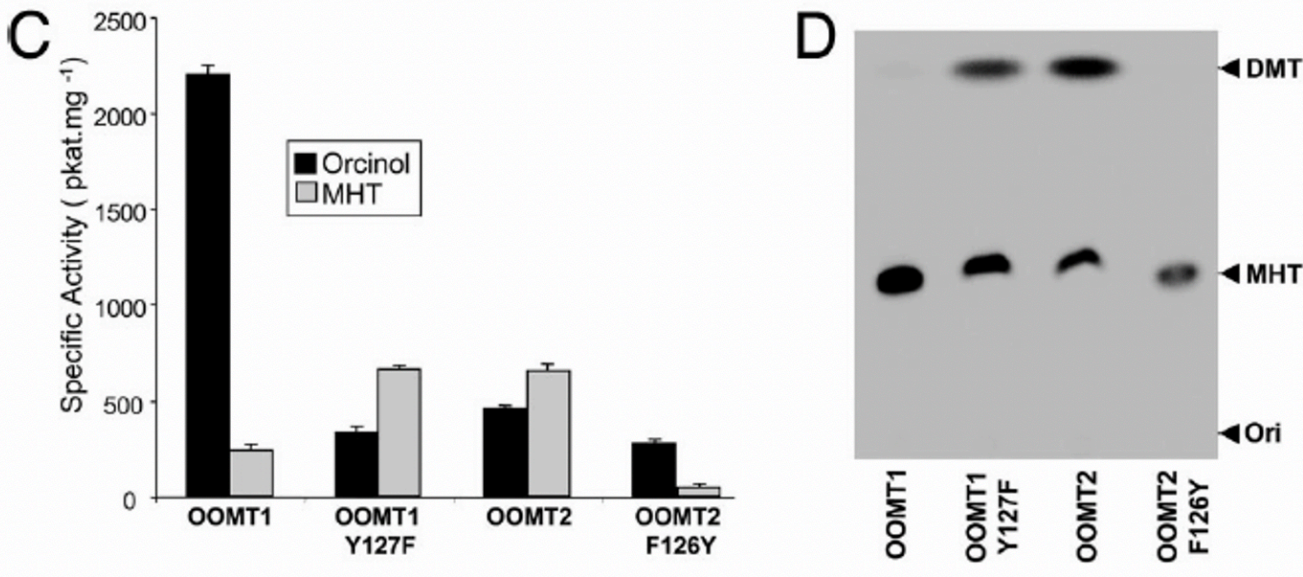


5. Quel est selon vous l'objectif de ces expériences de mutagenèse dirigée ?

La mutagenèse ciblée sur un acide aminé du site actif a pour objectif de montrer que les différences de spécificité de liaison au substrat et de réaction sont principalement dues à un seul acide aminé.

6. Exploitez les résultats de la figure 2.

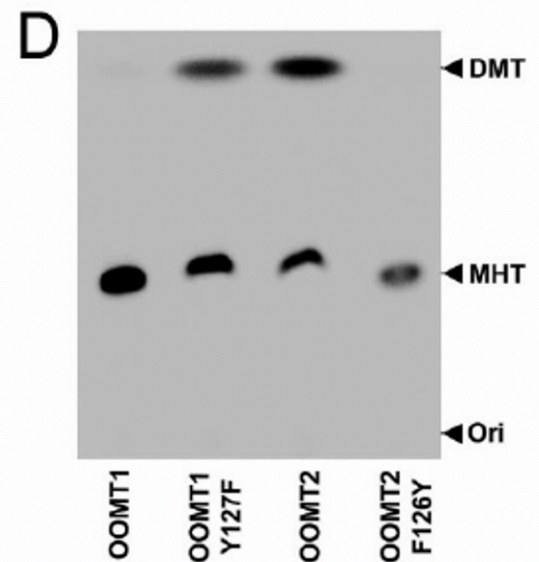
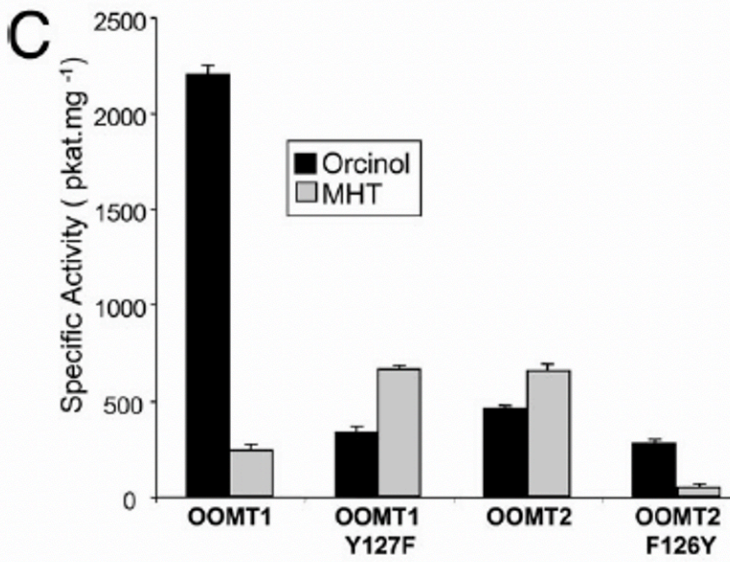




Le document C montre que OOMT1 a une activité spécifique environ 11 fois plus forte sur l'orcinol vs MHT alors que celle de OOMT2 n'est que que 30% plus forte sur MHT vs Orcinol. Ainsi chaque enzyme peut catalyser la transformation des deux substrats mais l'efficacité et la polyvalence de OOMT1 sont meilleures. Le mutant OOMT1 Y127F présente quasiment la même activité spécifique que OOMT2 sur chaque substrat. Le seul remplacement de Tyr tyrosine par Phe suffit à modifier les propriétés catalytiques de l'enzyme.

Le mutant OOMT2 F126Y présente une activité spécifique relativement peu modifiée sur orcinol alors qu'elle est quasiment inhibée sur MHT, son substrat naturel.

Ces résultats suggèrent que Phe assure la spécificité enzymatique à MHT et Tyr la spécificité enzymatique à l'Orcinol.



Le document D montre que chaque enzyme mutée acquiert la capacité catalytique de l'autre (OOMT1 muté en piste 2 et OOMT2 en piste 4) mais seule OOMT1 conserve ses propriétés catalytiques natives puisque du MHT existe sur la piste 2. OOMT2 perd son activité catalytique native (absence de DMT en piste 4).

Les effets de la mutation dirigée sont donc plus sévères pour OOMT2 que pour OOMT1



## 7. *Quelle signification évolutive ces résultats suggèrent-ils ?*

On peut penser que les gènes OOMT qui codent pour les protéines OOMT1 et OOMT2 ont probablement évolué à partir d'un gène de type OOMT ancestral qui a des homologues dans les génomes de toutes les roses existantes.

Les auteurs de l'article (G.Scalliet & al, Scent evolution in Chinese roses, PNAS April 15, 2008 vol. 105 no.15 5927-5932), proposent que l'émergence du gène OOMT1 peut avoir été une étape critique dans la évolution de la production de parfums dans les roses chinoises.

## Exercice 6 :Analyse de Western Blot et vérification de l'effectivité d'une transgénèse

La bactérie *Staphylococcus aureus* est responsable, chez les Mammifères, d'une infection de la glande mammaire nommée mammite. Une équipe de scientifiques a construit un transgène qui inclut l'information génétique pour produire naturellement une protéine antimicrobienne appelée lysostaphine.

Ce transgène est destiné à être introduit chez des vaches, de façon à les protéger de la mammite.

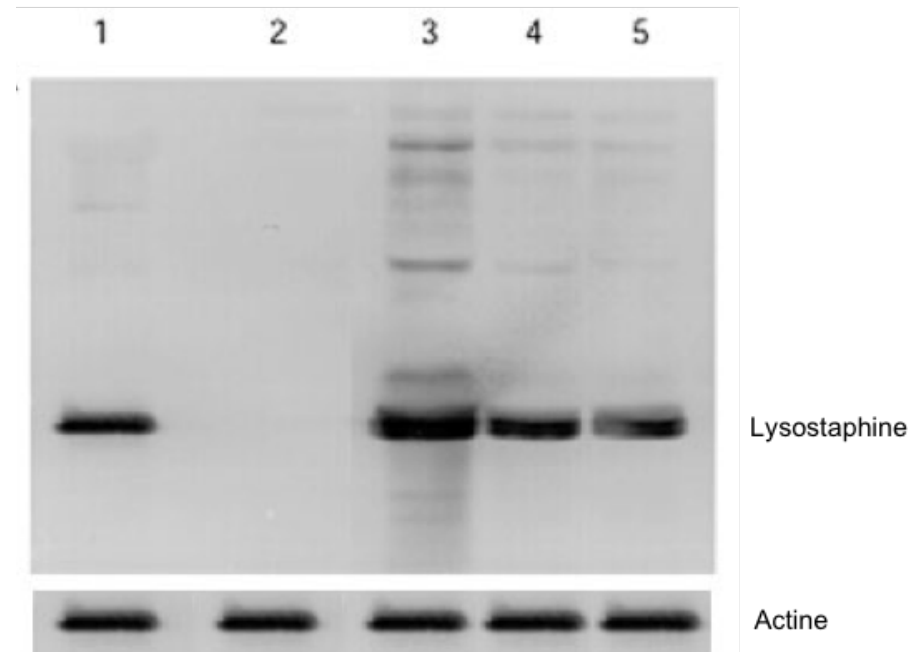
Pour tester l'efficacité de ce transgène, on l'a inséré chez des souris et l'on a testé par *Western blot* la production de lysostaphine dans leur lait. Voici le résultat obtenu :

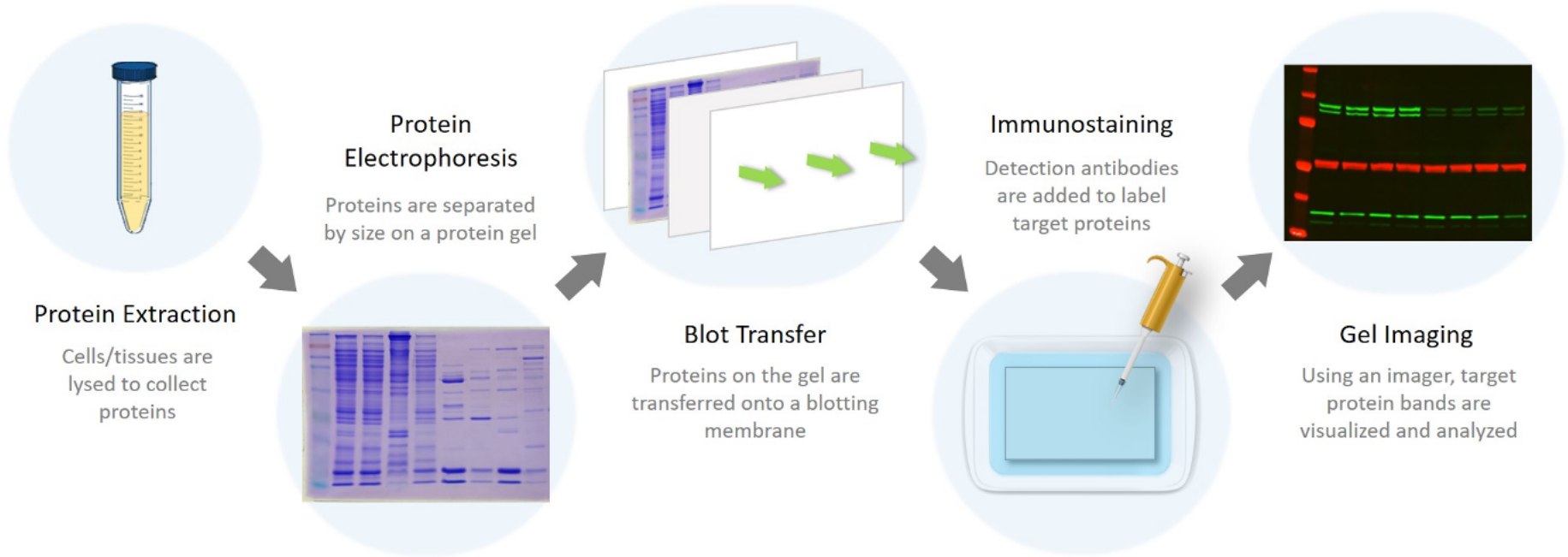
Pistes :

1 : témoin positif de lysostaphine ;

2 : lait de souris non transgénique ;

3 à 5 : lait de 3 souris transgéniques.





Extraction des protéines des cellules et des tissus.

Électrophorèse de gel de protéines dans des conditions de dénaturation. SDS-PAGE (gels de polyacrylamide et le détergent SDS).

Transfert des protéines incorporées dans le gel de polyacrylamide sur une membrane de transfert, comme la nitrocellulose à l'aide d'un buvard électrophorétique.

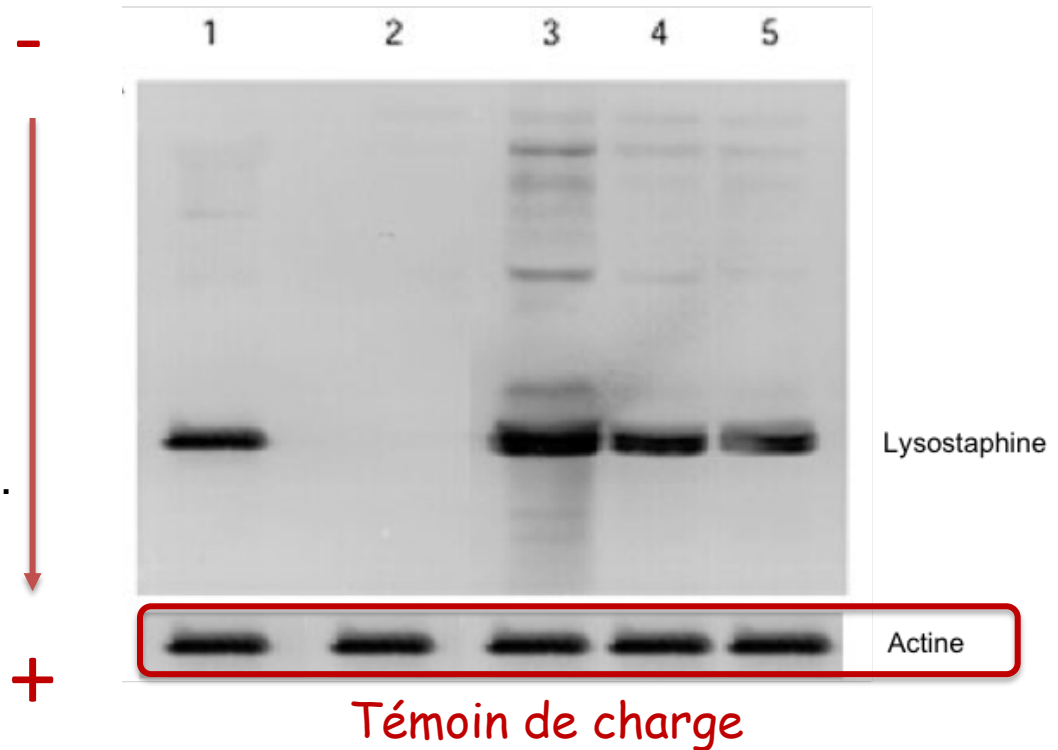
Immunocoloration - La membrane est incubée dans une solution contenant des anticorps primaires spécifiques aux protéines d'intérêt. Elle est suivie par des cycles de lavage et d'une autre incubation avec des anticorps secondaires qui contiennent des étiquettes pour la détection. Des étiquettes fluorescentes peuvent également être utilisées.

Imagerie sur gel - Pour visualiser les bandes de protéines d'intérêt, des imageurs sur gel spécialisés sont utilisés. Ils sont également souvent équipés d'un logiciel d'analyse qui peut mesurer l'intensité des bandes, ce qui permet une analyse de transfert Western qualitative et semi-quantitative

1. Indiquez le sens de migration des protéines.
2. Connaissant les conditions de réalisation d'un Western blot, placez les bornes du générateur sur la figure.
3. Quel est l'intérêt de rechercher la présence d'actine dans cette expérience ?
4. Qu'aurait-on obtenu si, au lieu de faire un Western blot, on avait simplement coloré la membrane de nitrocellulose avec du rouge Ponceau ?
5. Exploitez ces résultats pour répondre à la question posée par les chercheurs.

Pistes :

- 1 : témoin positif de lysostaphine ;
- 2 : lait de souris non transgénique ;
- 3 à 5 : lait de 3 souris transgéniques.

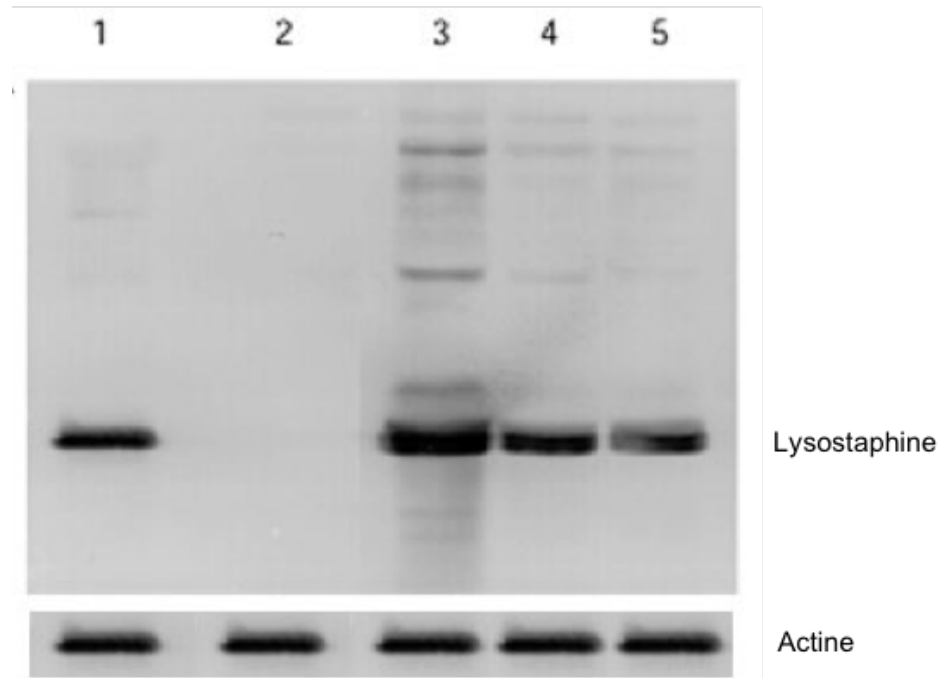


1. *Qu'aurait-on obtenu si, au lieu de faire un Western blot, on avait simplement coloré la membrane de nitrocellulose avec du rouge Ponceau ?*
2. *Exploitez ces résultats pour répondre à la question posée par les chercheurs.*

Pistes :

- 1: témoin positif de lysostaphine ;
- 2 : lait de souris non transgénique ;
- 3 à 5 : lait de 3 souris transgéniques.

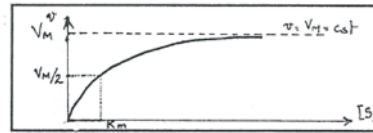
Les 3 transgènes fonctionnent mais la trace unique sur la piste 5 suggère une efficacité meilleure, sans molécules intermédiaires reconnues par les Ac



Le rouge Ponceau colore les protéines totales après le transfert des protéines d'un gel d'acrylamide vers une membrane de nitrocellulose. Elle permet de contrôler la quantité de protéines déposées sur le gel et présentes sur la membrane. Nous aurions obtenu davantage de bandes; , notamment sur la piste 2 car le western blot ne met en évidence que les protéines reconnues par l'anticorps

### Courbe à connaître absolument

- \*  $V_M$  est obtenue lorsque toute l'enzyme est engagée dans la formation du complexe E-S, et mesure la dissociation de E-S, donc la formation de P.
- \*  $K_m$  mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat (cf. cours). Par définition,  $K_m$  est égale à la concentration en substrat nécessaire pour avoir  $v = V_M / 2$
- Une forte affinité  $\Leftrightarrow K_m$  petit (et inversement)



Equation de la courbe (à connaître):  $v = \frac{V_M [S]}{K_m + [S]}$

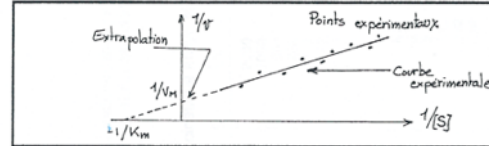
Quelques cas particuliers (à connaître)

$[S] \ll \frac{K_m}{10} \rightarrow v = k[S] \Rightarrow$  linéaire  
 $[S] \gg 10K_m \rightarrow v = V_M = \text{cst}$

\* Pour des raisons théoriques et pratiques, on utilise en pratique la représentation:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_m}{V_M} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Expérimentalement, on obtient une droite que l'on extrapole ce qui permet de déterminer  $V_M$  et  $K_m$ . Cette représentation est très utilisée car très pratique et très précise.



### \* Unités

- **Activité enzymatique:** 1 Unité d'Activité Enzymatique représente la quantité d'enzyme permettant la transformation de 1 micromole de substrat par minute dans les conditions optimales L'ancienne unité, le katal transformait 1 mole/sec  $\Rightarrow$  1 U.A.E. = 1/60 de  $\mu\text{kat}$ .
- **Activité moléculaire:** mesure le nombre de molécules transformées en une minute par une molécule d'enzyme.

I. Compétitif	I. Non Compétitif	I. Incompétitif
<p>Si [I] augmente, la courbe se redresse en pivotant autour de <math>1/V_M</math></p>	<p>Si [I] augmente, la courbe se redresse en pivotant autour de <math>-1/K_m</math></p>	<p>Si [I] augmente, la courbe se déplace vers le haut parallèlement à elle-même.</p>

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

$$K'_m = K_m \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$

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  $\rightarrow K_m$  ne change pas

$$V_m = \frac{V_m}{\left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right]}$$

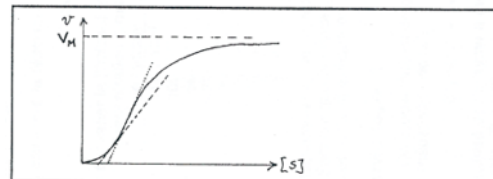
Si [I]  $\uparrow$ , alors  $\frac{1}{V'_M} \uparrow$  et  $V'_M \downarrow$

Théoriquement hors programme, mais peut être donnée à découvrir dans un TP style ENS.

$$\frac{1}{K'_m} = \frac{1}{K_m} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

$$\frac{1}{V'_M} = \frac{1}{V_M} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

### La cinétique coopérative, improprement appelée cinétique allostérique



La cinétique coopérative est due à une coopération de protomères d'enzymes allostériques. La courbe représentative n'est pas une droite, mais une sigmoïde (de même que la courbe  $1/v = f(1/[S])$ ). Il faut tracer  $v = f([S])$  d'après les données expérimentales.

L'intersection de la tangente à la courbe et de l'axe des abscisses indique l'augmentation de l'affinité avec le nombre de protomères recrutés (cf cours sur Hb).