

TD n°01 D'ENZYMOLOGIE

TD n°1 d'enzymologie

Donnez un nom systématique et les 3 premiers chiffres de la nomenclature aux enzymes catalysant les réactions suivantes

[1]
$$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ (\text{CHOH})_3 \\ | \\ \text{CH}_2\text{O} \\ | \\ \text{P} \\ | \\ \text{O} \end{array} \xrightarrow{\text{Fructose 1,6-bisphosphate}} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{CHOH} \\ | \\ \text{CH}_2\text{O} \\ | \\ \text{P} \\ | \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{CHOH} \\ | \\ \text{CH}_2\text{O} \\ | \\ \text{P} \\ | \\ \text{O} \end{array}$$

[2] $\text{NADH} + 2 \text{ Ferriytochrome } b_5 \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{ Ferroytochrome } b_5$

[3] $\text{UDP-galactose} \rightleftharpoons \text{UDP-glucose}$

[4] $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+ \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^- + \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

[5] $\text{NH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{P} \begin{array}{l} \text{O} \\ | \\ \text{O} \\ | \\ \text{O} \end{array} + \text{NH}_3^+-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^-$
 \downarrow
 $\text{NH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^- + \text{OH}^--\text{P} \begin{array}{l} \text{O} \\ | \\ \text{O} \\ | \\ \text{O} \end{array}$

[6] $\text{ATP} + \text{H}-\overset{\text{COOH}}{\text{C}}-\text{NH}_2 + \text{Dala} \rightarrow \text{NH}_3^+-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{COO}^- + \text{APP} + \text{P}_i$

[7] $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{CHOH} \\ | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} + \text{NAD}^+$

[8] $\text{CHO}-\text{CHOH}-\overset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{O}-\text{P} \rightleftharpoons \text{CHOH}-\text{CHO}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{P}$

[9] $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H} + \text{CO}_2$

[10] $\text{HO}-\underset{\text{O}}{\underset{\text{P}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CH}_2=\underset{\text{O}}{\underset{\text{P}}{\text{C}}}-\text{CO}_2\text{H} + \text{H}_2\text{O}$

Corrigé-type

Réaction 1:
nom systématique : D-fructose 1,6 biphosphate glyceraldéhyde 3 phosphate
lyase
code EC : 4.1.2. x_4

Réaction 2:
nom systématique : NADH ferri cytochrome oxydo réductase
code EC : 1.6.2. x_4

Réaction 3:
nom systématique : UDP-galactose 4 épimérase
code EC : 5.1.3. x_4

Réaction 4:
nom systématique : Acétylcholine esterase (Hydrolase des liaisons ester)
code EC : 3.1.1. x_4

Réaction 5:
nom systématique : ornithine carbonyl transférases
code EC : 2.1.3. x_4

Réaction 6:
nom systématique : D-alanine (D-alanine) ligase
EC : 6.3.2. x_4

Réaction 7:
nom systématique : glycerol-NAD⁺ oxydo réductase
code EC : 1.1.1. x_4

Réaction 8:
- nom systématique : Glyceraldéhyde 3 phosphate isomérase
- code EC : 5.3.1. x_4

Réaction 9:
- nom systématique : pyruvate carboxylase (α-carboxylase)
- code EC : 4.1.1. x_4

Réaction 10:
- nom systématique : 2 phosphoglyoxalate déshydrogénase (Hydrolase)
- code EC : 4.2.1. x_4

TD n°02 D'ENZYMOLOGIE

Questions de révision : donnez aux termes suivants une définition concise, mais complète
Catalyseur, Enzyme, Site actif, Double spécificité enzymatique

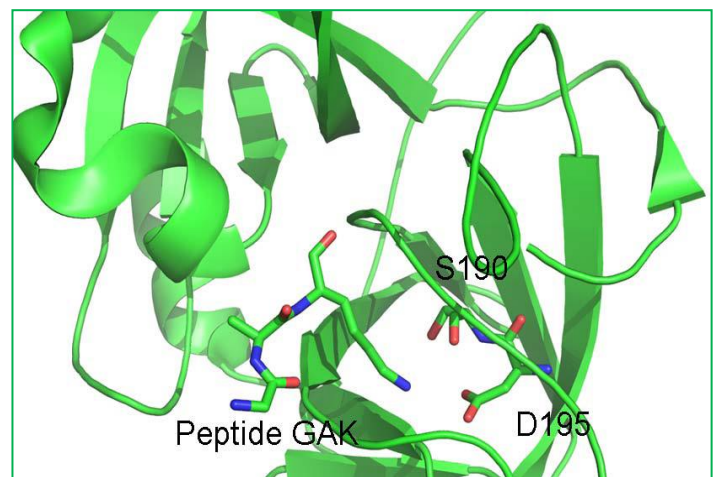
Exercice 1 : répondez par vrai ou faux aux affirmations suivantes et justifiez votre réponse

- a)-les enzymes sont des transporteurs de molécules
- b)-les enzymes sont modifiés par la réaction de transformation de substrat en produit
- c)-le site actif est nécessairement spécifique d'un seul substrat
- d)-le site actif est composé de quelque acide aminé rapproché dans la structure primaire

Exercice 2 :

La trypsine est une protéase qui coupe après les acides aminés chargés positivement K ou R. La structure ci-dessous en complexe avec le peptide GAK montre le résidu responsable de cette spécificité.

1. Comment est établie cette spécificité ?
2. Que risque-t-il de se passer si on mute D195 en K ? en H ?



Exercice 3 :

Soient trois enzymes différents E1, E2 et E3 , qui sont activables dans certaines conditions :

- a. l'activation de E1 s'accompagne d'un changement de configuration quaternaire, sans Changement de poids moléculaire ;
- b. l'activation de E2 s'accompagne d'une diminution de poids moléculaire de l'enzyme;
- c. l'activation de E3 est contrariée par l'addition d'une phosphatase.

- Indiquer les modèles d'activation rendant compte de chacune de ces trois Situations.
- Donner un exemple de chacun des modèles.

Corrigé-type

Question de révision :

Catalyseur : substance chimique qui agit à des concentrations très faible pour accélérer la vitesse des réactions chimiques et reste intacte à la fin de la réaction

Enzyme : sont des catalyseurs biologique de nature protéique

Double spécificité: une enzyme donnée ne peut reconnaître qu'un seul substrat c'est la spécificité de substrat, elle ne catalyse qu'une seule réaction parmi l'ensemble des réactions possibles c'est la spécificité de réaction

Exercice 1:

a) faux –les enzymes sont des transformateurs de molécules

b) faux- les enzymes sont des catalyseurs qui restent intacte à la fin de la réaction

c) faux-le site actif est nécessairement spécifique d'un seul substrat dans le cas des enzymes qui possèdent une spécificité absolue (glucokinase-glucose) mais les enzymes qui possèdent une spécificité large le site actif peut réagir avec une classe de substrats qui possèdent des groupements fonctionnels communs (hexokinse –les hexoses (glucose, galactose, mannose)

d)-le site actif est composé de quelques acides aminés éloignés dans la structure primaire mais rapproché par le repliement de la protéine enzymatique sur elle-même dans la structure tertiaire

Exercice 2 :

1) cette spécificité est due à la complémentarité de charge entre les groupements fonctionnel des acides aminés du site actif et les groupements fonctionnel de substrat (peptide GAK=Glycine-alanine lysine).le substrat contient un acide aminé chargé positivement la lysine(k) et le site actif contient un acide aminé chargé négativement l'aspartate (D195) ce qui permet l'établissement de liaison ionique entre la fonction COO^- de l'aspartate et la fonction NH_3^+ du peptide GAK

2)si on mute D195 du site actif en k (lysine) ou H(histidine) qui sont des acides aminés chargé positivement, l'enzyme dans ce cas ne peut pas fixer le peptide GAK qui est aussi chargé positivement (répulsion) ce qui provoque un changement de la spécificité de substrat .l'enzyme ne peut pas couper après les acides aminés chargés positivement mais elle coupe après les acides aminés chargé négativement aspartate et glutamate .donc cette mutation au niveau du site actif modifie la spécificité de substrat mais n'influence pas la spécificité de réaction (hydrolase des liaison peptidique.

Exercice 3:

1) les modes de régulations sont :

a) E1 : L'activation qui s'accompagne par un changement conformationnel est la régulation allostérique dans laquelle des molécules de petite taille dite effecteur allostérique (inhibiteur ou activateur se fixent sur le site allostérique et provoque un changement conformationnel avec augmentation ou diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat

b) E2 : Les acides aminés possèdent un poids moléculaire moyen de l'ordre de 110 Da, l'activation qui s'accompagne d'une diminution de PM de l'enzyme implique l'élimination de quelques acides aminés après coupure de quelque liaisons peptidiques, donc E2 est activée par protéolyse limitée

c) E3 : L'activation de E3 est contrarié par l'addition d'une phosphatase (enzyme qui élimine le groupement phosphate) c'est-à-dire E2 est active sous forme phosphorylée mais l'addition d'une phosphatase (déphosphorylation) conduit à l'inactivation de E2

Donc E2 est régulée par modification covalente

Exp E1 : aspartate transcarbamoylase (ATCase) est régulée par deux effecteurs allostériques (ATP activateur, CTP inhibiteur)

Exp E2 : les enzymes pancréatiques (trypsine, chymotrypsine) sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs trypsinogènes, chymotrypsinogène.

Exp E3 : La glycogène phosphorylase est activée par phosphorylation (catalysé par des kinases) et inactivé par déphosphorylation (catalysé par des phosphatases)

TD n°3 : Enzymologie

Q1/ Pourquoi les enzymes protéolytiques sont souvent synthétisées sous forme de zymogène inactif ?

Q2/ Quel avantage voyez-vous à ce que le produit final d'une voie métabolique inhibe l'enzyme qui catalyse la première réaction ?

Q3/ Indiquez la signification métabolique de la régulation allostérique l'ATCase et de la glycogène phosphorylase par leurs effecteurs allostériques

Exercice 4 :

L'expérience d'Anfinsen : L'expérience porte sur une enzyme digestive présente dans le suc pancréatique. Il s'agit de la ribonucléase, enzyme de 124 acides aminés, contenant quatre liaisons disulfures assurant le repli dans l'espace de la protéine selon une configuration spatiale précise. Anfinsen traite une ribonucléase active par un agent réducteur (β mercaptoéthanol) qui provoque une perte de l'activité enzymatique. Comment expliquez-vous de manière simple, cette perte d'activité de la ribonucléase ?

Corrigé-type :

R1 : la plupart des enzymes protéolytiques sont synthétisées sous forme de zymogène (précurseur inactif)

-les enzymes pancréatiques (trypsine, chymotrypsine) sont synthétisées sous forme de zymogène afin de prévenir la dégradation des protéines des cellules acineuse qui les synthétisent (la pancréatite est une inflammation du pancréas, elle est causée par une activation prématuré des zymogènes)

Donc la synthèse de ces enzymes pancréatique sous forme de zymogène est une façon de retarder l'expression de leurs activité jusqu' au lieu approprié.

R2 : L'inhibition de la première enzyme par le produit final de la voie métabolique (la rétroinhibition) permet à la cellule d'économiser du substrat et de l'énergie et d'empêcher l'accumulation de métabolites inutiles et parfois nuisibles pour la cellule (déchets métaboliques)

R3 :

a)La signification métabolique de la régulation allostérique de l'ATCase par l'ATP et CTP

-L'ATCase est l'enzyme qui catalyse la première réaction de la voie métabolique de synthèse de nucléotide pyrimidique (UTP, TTP, CTP), le CTP est le produit final de cette voie métabolique

-L'ATP est un nucléotide purique synthétisé par une autre voie métabolique

* Le CTP est l'inhibiteur allostérique de l'ATCase : l'inhibition de l'ATCase par le CTP permet d'économiser l'énergie, les substrats et empêche l'accumulation de CTP dans la cellule

Si [CTP] augmente ===== le CTP inhibe l'ATCase

* l'ATP est l'activateur allostérique de l'ATCase, l'activation de l'ATCase par l'ATP permet de coordonner la vitesse de synthèse de nucléotides puriques et pyrimidiques pour la synthèse d'ADN (qui nécessite un appariement de base)

Si $[ATP]$ est supérieure $[CTP]$ =====L'ATCase est activée par l'ATP pour produire le CTP jusqu'à ce que l'équilibre soit rétablie

b) la signification métabolique de la régulation allostérique de la glycogène phosphorylase par l'ATP, glucose 6 phosphate et l'AMP

Le glucose 6phosphate est un produit de dégradation de glycogène, l'ATP est le produit final de la dégradation de glycogène

Si $[ATP][\text{glucose 6 phosphate}]$ augmente, ces deux effecteurs inhibent la glycogène phosphorylase pour arrêter la dégradation de glycogène parce qu'il y a suffisamment d'énergie dans la cellule

Si $[AMP]$ augmente (l'AMP est issu de la dégradation d'ATP) cela signifie que le niveau énergétique cellulaire est bas et qu'il faut produire d'ATP, Donc l'AMP active la glycogène phosphorylase pour dégrader le glycogène en glucose qui donne ensuite l'ATP ce qui permet de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule.

Exercice 4 : Le β mercaptoéthanol est un agent réducteur qui provoque la réduction et la coupure des ponts disulfure (transforme s-s entre deux cystéines en deux fonction thiol SH libre) qui stabilise la structure tertiaire biologiquement active de l'enzyme. Donc le β mercaptoéthanol n'a pas modifié la structure primaire de l'enzyme mais il a modifié la structure tertiaire qui est indispensable pour le rapprochement des acides aminés qui forme le site actif ===== ce qui conduit à une perte de l'activité enzymatique.