

6. Sachant que la variation d'absorbance est de 360/min, calculer l'activité de cette enzyme en katal ? (1.5 pt)

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\Delta \text{Abs. min} - 1.Vt}{\epsilon \cdot L \cdot Ve}$$

Activité enzymatique = 0,01 Katal/L

Exercice 2 (6 pts)

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

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

1. Indiquer les modèles d'activation rendant compte de chacune de ces trois Situations. (3 pts)

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 quelques liaisons peptidiques, donc E2 est activée par protéolyse limitée.

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

2. Donner un exemple de chacun des modèles. (3 pts)

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)

Exercice 3 (3 pts)

On étudie une réaction enzymatique où $K_1=10$, $K_2=10$, $K_3=10$ et $[S]=1.10^3M$. il y'a environ 1000 molécules d'enzymes E dans le milieu.

1. Quel est le % de [E] présent sous forme de [ES] par rapport au nombre total des molécules de E. (1 pt)

$[S]=1000M$ 1000 molécules de substrat

Nombre d'enzyme : 1000 molécules

Donc le % est de 100%

2. Quelle est la valeur de K_m (1 pt)

$K_m = k_2 + k_3 / k_1 = 2 \text{ moles}$

3. Quelle est la relation entre K_m et [S] lorsque la réaction évolue à 80% de sa V_{max} . (1 pt)

$V_i = 80\% V_{max}$

$V = v_{max} \cdot [s] / (k_m + [s])$ $0,8v_{max} = v_{max} \cdot [s] / (k_m + [s])$

$[s] = 4k_m$

Département de Biologie

L3 Biochimie

Module : Enzymologie Approfondie

le 21 /01 /2024

Durée 1h 30min

Corrigé type

Exercice 1 (8 pts)

La phosphofructokinase (PFK) est une enzyme composée de 4 sous-unités liées entre elles par des liaisons de faible énergie. Il existe 3 classes de sous-unités de poids moléculaires différents :

- Sous-unité L (PM 87500), Sous-unité M (PM 85000), Sous-unité C (PM 80000)

L'enzyme a été purifiée à partir de différents tissus de rat puis soumise à électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les quantités de chaque sous-unité trouvée dans les différents tissus ont été évaluées par densitométrie et par précipitation avec des anticorps spécifiques de chacune des 3 ss-u. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	Muqueuse intestinale	Cœur	Muscle squelettique	Diaphragme	Foie
% de ss-u L	50	50	75	-	-
% de ss-u M	-	-	25	100	100
% de ss-u C	50	50	-	-	-

1. Ecrire la réaction catalysée par cette enzyme

Fructose-6-phosphate + ATP → fructose-1,6-diphosphate + ADP. (1 pt)

2. Donnez la classe de l'enzyme : **la classe 2 : Transférase. (1 pt)**

3. Donner la formule des PFK de chaque tissu en fonctions des unités L, M et C. **(1 pt)**

Echantillon 1 : Muqueuse intestinale : L2 C2

Echantillon 2 : Cœur : L2 C2

Echantillon 3 : Muscle squelettique : L3 M

Echantillon 4 : Diaphragme : M4

Echantillon 5 : Foie : M4.

4. Quel est le nom et le rôle biologique de ces formes moléculaires différentes ayant une même activité. **(1.5 pt)**

Les isoenzymes : sont des enzymes oligomériques qui présentent plusieurs formes de structures quaternaires selon les proportions relatives des sous unités, elles ont la même spécificité de substrat et les mêmes spécificités de réaction mais d'activités distinctes. Des tissus différents expriment des isoenzymes différentes, ce qui permet une meilleure adaptation aux besoins métaboliques.

Pour mesurer l'activité d'enzyme, on mesure l'absorbance à 340 nm en fonction du temps, dans une cuve de 1 cm de trajet optique, de 1 ml de solution contenant l'enzyme et le substrat dont le coefficient d'extinction molaire est de 6000 L. mole⁻¹.cm⁻¹ à 340 nm. L'enzyme provient de 100 µl de sérum auquel on additionne 900 µl d'une solution de substrat.

5. Définir l'activité catalytique d'une enzyme en UI et en katal **(2 pts)**

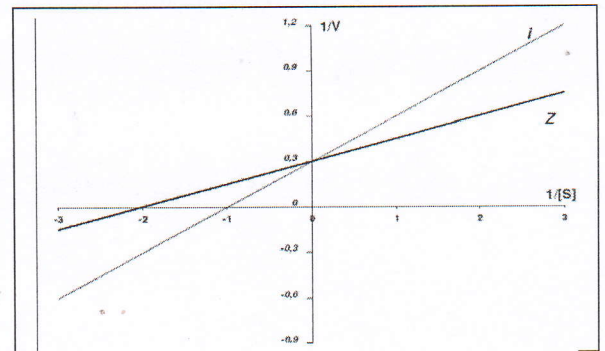
Définition de l'Unité Internationale (UI) : C'est la quantité d'enzyme qui transforme une µmole de substrat par minute, dans les conditions opératoires définies (pH, T°, ...).

Définition du Katal : C'est la quantité d'enzyme qui transforme une mole de substrat par seconde, dans les conditions opératoires définies (pH, T°, ...).

Exercice 4 (3 pts)

1. Le graphique suivant montre l'activité d'une enzyme en l'absence d'inhibiteur « Z » et en présence d'inhibiteur « i » (V est exprimé en mmol/min et [S] en mM). (1 pt)

- A) La V_{max} est 0,3mmol/min en l'absence d'inhibiteur
- B) La K_m est 0,5 mM en l'absence d'inhibiteur**
- C) La K_m est de 1mM en l'absence d'un inhibiteur
- D) L'inhibiteur est compétitif**
- E) L'inhibiteur est non compétitif



2. Expliquez les différences de cinétique entre les enzymes allostériques et les enzymes michaeliennes. (2 pts)

Si on trace $V=f([S])$, on obtient une courbe sigmoïde, reflète des interactions coopératives entre plusieurs sous unités, et non l'hyperbole caractéristique des enzymes michaeliennes.

La saturation est tout de même obtenue pour des concentrations de substrat suffisantes.

Bien qu'il existe sur la courbe sigmoïde de saturation une concentration de S pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximale, il n'est pas correct de l'appeler K_m ,

puisque l'enzyme n'est pas michaelienne. On utilisera les expressions $S_{0,5}$ ou $K_{0,5}$ ($K_{1/2}$) pour désigner cette concentration de substrat donnant pour une enzyme allostérique une vitesse de réaction égale à $V_{max}/2$.

Consultation le.
29-01-2024 a 9h00
SC 4.01