



UNIVERSITÉ PARIS EST CRETEIL
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

LICENCE SCB

TRAVAUX DIRIGES
ENZYMLOGIE
ANNÉE 2016 - 2017

PARTIE 1 : ETUDES EXPERIMENTALES

EXERCICE 1

Protocole de mesure d'une activité enzymatique

On considère la réaction $S \rightarrow P$ catalysée par une enzyme E.

Vous avez à votre disposition les produits nécessaires pour réaliser cette mesure : Une préparation commerciale d'enzyme, le substrat et les produits nécessaires pour préparer le tampon dans lequel la réaction sera effectuée. Ce tampon est utilisé pour préparer les solutions mères d'enzyme et du substrat aux concentrations adéquates pour la mesure de l'activité.

L'enzyme étudiée a son maximum d'activité à **pH 4,6**.

La préparation d'enzyme E contient **50 U/ml** (activité spécifique à cette préparation).

Le **K_M** de référence trouvé dans la littérature est d'environ **0,2 mM**.

Le produit **P** formé absorbe la lumière à **360 nm** ($\epsilon = 12\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

On se propose à mesurer **a_{max}** et **K_M** avec précision.

Milieu de mesure :

Q1 Quels sont les composants du milieu de mesure et les conditions réactionnelles qu'il faut définir avant de commencer les expérimentations ?

I. On doit d'abord mesurer avec précision l'activité maximale (a_{max}) de l'enzyme.

Concentration de substrat dans la cuve de mesure :

Q2. A quelle concentration le substrat doit-il se trouver dans la cuve de mesure ? Justifiez.

Q2b. A quelle concentration sera-t-il convenable de préparer la solution mère de substrat ? Justifiez.

Quantité d'enzyme dans la cuve de mesure :

Q3 Calculez l'activité (quantité d'enzyme) à utiliser pour une cuve de 3 ml. Calculez cette activité en U et puis transformez à ml en tenant compte de l'activité spécifique de la préparation. Le cas échéant, considérez la réalisation de dilutions, justifiez.

Q4 Une fois la quantité d'enzyme déterminée, comment pouvez-vous vérifier que cette quantité est convenable pour vos mesures ? Justifiez.

Q5 Selon la loi de Michaelis, quelle est l'expression de la vitesse à saturation du substrat ? Justifiez.

II. On veut déterminer précisément K_M dans nos conditions de mesure.

Q6 Quelles sont les mesures d'activité à réaliser pour mesurer avec précision K_M ? (Indiquez les concentrations de substrat à utiliser pour réaliser les mesures ?)

Q7 Proposez une concentration pour la solution mère de substrat que vous préparerez et quel volume de cette préparation vous introduirez dans chaque cuve.

Analyse des résultats :

Q8 Quelles sont les graphes à tracer pour déterminer avec précision K_M et a_{max} ?

EXERCICE 2

On étudie l'oxydation du propionaldéhyde (CH₃CH₂CHO) par une AldDH NADH dépendante dont les constantes caractéristiques sont les suivantes :

Masse molaire: 200000 g/mol k_{cat} = 110 min⁻¹ K_{M,NAD} = 78 μM K_{M,ald} = 0,15 μM

On dispose de 800 mg d'un extrait non purifié contenant 0,025 U/mg.

PART I

Protocole de mesure de l'activité

L'activité de cette enzyme peut être mesurée en suivant la production de NADH par colorimètre.

Q1 Quelles concentrations minimales d'aldéhyde et de NAD⁺ faut-il introduire dans la cuve pour que l'AldDH travaille à saturation ? Justifiez.

Q2 Quelle activité AldDH (en U) proposez-vous d'introduire dans une cuve de mesure de volume utile 3 mL ?

PART B

Inhibition par Pep-AD

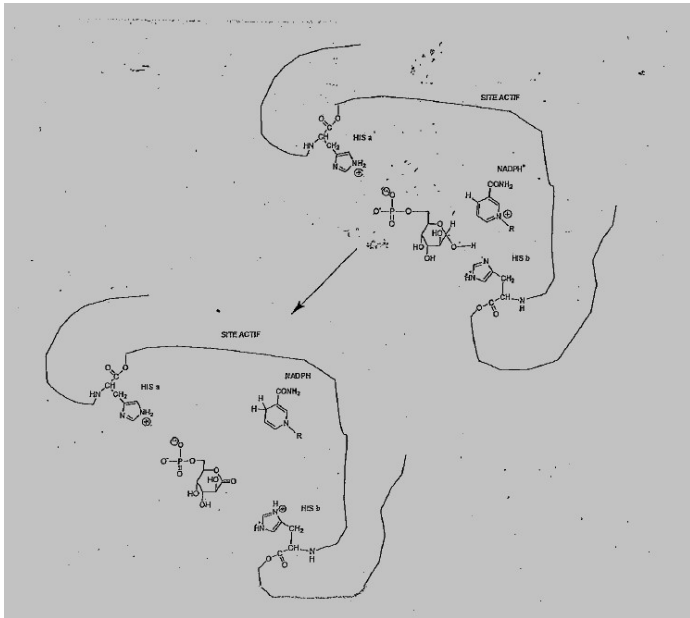
PepRn est un inhibiteur de la fixation de l'aldéhyde sur l'AldDH, de constante K_i environ 0,3 μmol/L (K_i de référence).

On veut mesurer K_i avec précision en effectuant des mesures d'activité, on utilise plusieurs mesures à 5 concentrations de **Ald** et 5 concentrations de **PepRn**.

Q3 Donnez les valeurs des concentrations de ces deux composés que vous proposez d'utiliser. Justifiez.

Q4 Donnez à l'échelle les courbes $a = f([Ald])$ que vous obtiendrez en absence et présence de **PepRn** à 0,3 μmol/L dans le cas où **PepRn** est un inhibiteur compétitif et dans le cas où il est un inhibiteur non compétitif.

Q5 Quel réseau de courbes faut-il tracer pour mesurer K_i. Dans le cas où **PepRn** est un inhibiteur compétitif donnez les courbes correspondant à **Ald** en excès et $[Ald] = 1,5 \mu\text{mmol/L}$.

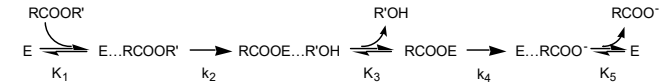


PARTIE 2 :
MODELES CINETIQUES ET LOIS DE VITESSES

EXERCICE 5

On considère l'hydrolyse d'un ester RCOOR' catalysée par une sérine protéase telle que la trypsine.

Le mécanisme de cette enzyme, en tenant compte de l'influence du produit, est le suivant :



Les étapes correspondant à l'association/dissociation sont caractérisées par la constante de dissociation K_i ; celles qui sont irréversibles par leur constante cinétique k_i .

La vitesse de la réaction peut s'exprimer selon :

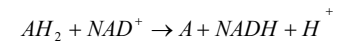
$$V = \frac{d[\text{R'OH}]}{dt} = \frac{d[\text{RCOO}^-]}{dt} = k_2 [\text{E} \dots \text{RCOOR}'] = k_4 [\text{RCOOE}]$$

$$\text{Il en résulte que : } \frac{[\text{RCOOE}]}{[\text{E} \dots \text{RCOOR}']} = K_4$$

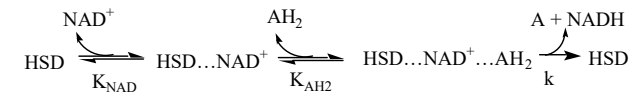
- 1) Établissez la loi de vitesse correspondant à ce modèle.
- 2) Donnez les expressions des constantes vrais k_{cat} et K_M caractérisant cette enzyme.
- 3) Donnez les expressions des constantes apparentes $k_{cat,app}$ et $K_{M,app}$ en fonction des concentrations des produits RCOO^- et R'OH .
- 4) Dans le cas où la concentration de R'OH est nulle :
 - Donnez l'expression des constantes apparentes $k_{cat}(\text{RCOO}^-)$ et $K_M(\text{RCOO}^-)$.
 - Quel est le type d'inhibition provoqué par RCOO^- ?
 - Quelle est l'expression de la constante d'inhibition ?
- 5) Dans le cas où la concentration de RCOO^- est nulle,
 - Donnez l'expression des constantes apparentes $k_{cat}(\text{R'OH})$ et $K_M(\text{R'OH})$.
 - Quel est le type d'inhibition provoqué par R'OH ?

EXERCICE 6

La 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD) catalyse à pH 7 l'oxydation par le NAD^+ de l'androstérone (qui sera par la suite désignée par AH_2) :

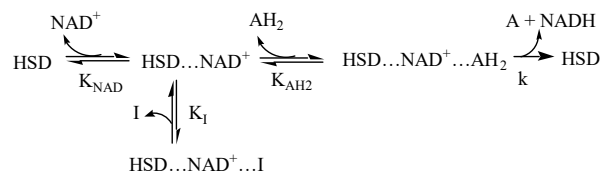


Le mécanisme proposé pour cette oxydation par Penning et coll. est le suivant :



1) Par quel type de mécanisme les deux substrats se fixent-ils sur l'enzyme ?

L'indométhacine, représentée par I, se fixe sur l'enzyme en formant un complexe improductif de la façon suivante :



2) Montrer que l'activité de l'enzyme en présence de NAD^+ , AH_2 et I s'exprime selon la loi suivante :

$$a = \frac{k [E]_T [\text{NAD}^+] [\text{AH}_2]}{K_{\text{AH}_2} \{K_{\text{NAD}} + [\text{NAD}^+] (1 + \frac{[\text{I}]}{K_1})\} + [\text{NAD}^+] [\text{AH}_2]}$$

3) On mesure l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration d' AH_2 dans un milieu contenant un excès de NAD^+ et une concentration fixée de I .

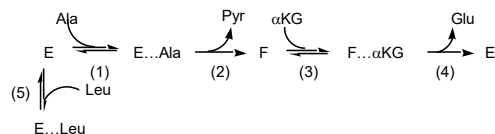
- Donnez l'expression simplifiée de l'activité dans ces conditions.
- Quelles sont les expressions de K_{M,AH_2} et k_{cat} en absence de I ?
- Quel est le type d'inhibition provoqué par I ?
- Pouvez-vous prévoir sans calcul ces résultats à partir du modèle cinétique ci-dessus ?

4) On mesure maintenant l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration de NAD^+ dans un milieu contenant des concentrations fixées de AH_2 et I . (AH_2 n'est pas en excès)

- Donnez les expressions de $k_{\text{cat}(\text{AH}_2)}$ et de $K_{M,\text{NAD}(\text{AH}_2)}$ en absence de I .
- Donnez les expressions de $k_{\text{cat}(\text{AH}_2,\text{I})}$ et de $K_{M,\text{NAD}(\text{AH}_2,\text{I})}$ en présence de I .
- Quel est le type d'inhibition provoqué par I ?
- Pouvez-vous prévoir sans calcul le type d'inhibition à partir du modèle cinétique ci-dessus ?

EXERCICE 7

Le mécanisme de l'alanine transaminase est de type ping-pong. La leucine se fixe en compétition avec l'alanine :



Montrez que $\frac{[\text{F} \dots \alpha\text{KG}]}{[\text{E} \dots \text{Ala}]} = K_A$. Donnez l'expression de K_A

la loi de vitesse est de la forme :

$$a = \frac{k_2 [E]_T [\text{Ala}] [\alpha\text{KG}]}{(1 + K_A) [\text{Ala}] [\alpha\text{KG}] + K_1 [\alpha\text{KG}] (1 + \frac{[\text{Leu}]}{K_5}) + K_A K_3 [\text{Ala}]}$$

- Donnez l'expression des constantes catalytiques **vraies**. Lors d'un protocole expérimental *Quelles sont les graphes que vous traceriez pour déterminer ses constantes* (A chaque fois indiquez les composés utilisés).
- Exprimez la constante apparente $k_{\text{cat}}(\text{Leu})$ et commentez. *Quels sont les graphes que vous traceriez pour déterminer cette constante* (indiquez les composés utilisés)
- Donnez les expressions des constantes de Michaélis apparentes $K_{M,\alpha\text{KG}}(\text{Leu})$ et $K_{M,\text{Ala}}(\text{Leu})$. Que pouvez-vous conclure ? *Quels sont les graphes que vous traceriez pour déterminer ces constantes*. Indiquez les composés utilisés et l'allure des courbes que vous envisagés d'obtenir.
- Pouvait-on prévoir ces résultats *a priori*.

EXERCICES SUPPLEMENTAIRES (Travaux personnels)

Exercice A

Une enzyme de masse molaire 60 kDa a une activité spécifique moléculaire égale à 10^3 s^{-1} pour un substrat X.

Une préparation de cette enzyme contient 100 U/mg.

Quel est son degré de pureté ? (celui-ci sera défini comme le pourcentage d'enzyme active par rapport aux protéines totales.)

Exercice B

Les Matrix Metalloproteinases (**MMPs**) appartiennent à une famille d'endopeptidases sécrétées ou associées à la membrane cellulaire. Les MMPs sont capables, entre autres, de dégrader des composants de la matrice extracellulaire et ainsi réguler de processus comme l'embryogénèse, la cicatrisation et l'inflammation. Les **MMPs** sont des cibles thérapeutiques pour le traitement de nombreuses maladies. On cherche à analyser l'activité de la **MMP-1** que l'on a produite chez la bactérie puis purifiée.

Le substrat est un thiopeptide qui, clivé par la **MMP-1**, génère en fin de réaction un produit coloré (le **TNB**) qui peut être détecté à 412 nm ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Le K_M de cette enzyme pour le thiopeptide est d'environ 150 μM . L'activité spécifique théorique de cette préparation d'enzyme est d'environ 1 U/ μl . La solution mère de thiopeptide est à 100 mM.

I. On cherche à déterminer a_{max} et K_M avec précision.

1.1) *Quelle méthode proposez-vous d'utiliser ? Justifiez succinctement.*

1.2) *Quels paramètres du milieu d'étude non précisés dans l'énoncé devrez-vous fixer ?*

II. Détermination d' a_{max}

2.1) *Calculez le volume d'enzyme à introduire dans le milieu réactionnel.*

2.2) *A quelle concentration en thiopeptide devez-vous travailler pour mesurer a_{max} et quel volume de solution mettez-vous dans le milieu réactionnel ?*

2.3) *Quel contrôle aurez-vous à réaliser pour vérifier que l'enzyme n'est pas à saturation dans le milieu réactionnel ?*

IV. Mesure de l'activité par la technique du pHstat

On souhaite étudier la même réaction enzymatique par la technique du pH-stat.

4.1) Rappelez le principe de cette méthode.

On dispose d'une cuve de volume utile 30 mL et d'une microburette permettant d'introduire au maximum 1 mL de réactif de dosage (NaOH 10 mM) au cours d'un essai.

4.2) Quelles sont les concentrations des substrats à utiliser lors de la détermination d' a_{max} et de K_M ?

4.3) Comparer ces concentrations avec celles à utiliser lors des mesures par colorimétrie et commentez.

4.4) Quelle activité de MMP-1 devez-vous introduire dans la cuve ?

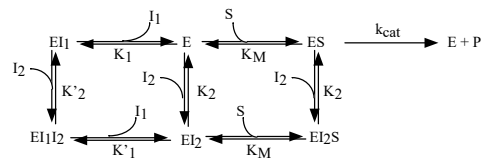
4.5) Comparer cette activité à celle à utiliser lors des mesures par colorimétrie et commentez.

Exercice C

On considère une enzyme E catalysant la réaction $S \rightarrow P$ selon un mécanisme michaélien simple.

À une préparation de E et de S, on ajoute simultanément deux inhibiteurs I_1 , compétitif et I_2 , non compétitif.

I. Le modèle cinétique décrivant alors l'action de ces deux inhibiteurs est le suivant :



1.1 Quelle relation existe-t-il entre K_1 , K_2 , K'_1 et K'_2 ?

1.2 Posez les équations permettant d'établir la loi de vitesse correspondante.

En résolvant celle-ci, on montre que la loi de vitesse est de la forme :

$$a = \frac{k_{cat} [E_T] [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I_1]}{K_1} + \frac{[I_2]}{K_2} + \frac{[I_1][I_2]}{K_1 K'_2}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I_2]}{K_2}\right)}$$

1.3 Donnez l'expression des constantes apparentes $K_M(I_1, I_2)$ et $k_{cat}(I_1, I_2)$ caractérisant l'activité de l'enzyme dans le milieu d'étude.

II. Deux cas limites peuvent être envisagés, dits à fixations exclusives et à fixations indépendantes.

Cas des fixations indépendantes

Ce modèle intervient si I_1 et I_2 se fixent sur deux sites différents n'interagissant pas l'un sur l'autre. Par exemple I_1 se fixe au site actif et I_2 sur un autre site. Dans ces conditions $K'_1 = K_1$ et $K'_2 = K_2$

2.1 Quelles sont alors les expressions de $K_M(I_1, I_2)$ et $k_{cat}(I_1, I_2)$ (Pensez à simplifier l'expression de

$K_M(I_1, I_2)$).

2.2 Pouvez-vous prévoir ce résultat à partir du modèle cinétique ?

Cas des fixations exclusives

Ce modèle intervient si I_1 et I_2 se fixent au même site. La fixation de l'un interdit alors celle de l'autre. Autrement dit $E I_1 I_2$ n'existe pas

2.3 Donnez alors les valeurs limites de K'_1 et K'_2 .

2.4 Quelles sont alors les expressions de $K_M(I_1, I_2)$ et $k_{cat}(I_1, I_2)$.

2.5 Montrez que dans une préparation contenant I_2 à concentration fixée, I_1 se comporte comme un inhibiteur compétitif dont la constante apparente $K_I(I_2)$ est fonction de la concentration de I_2 .

2.6 Pouvez-vous prévoir qualitativement ce résultat à partir du modèle cinétique ?