

T. D. n° 4 (cinétique enzymatique à un substrat)

Exercice n° 1 :

En utilisant l'équation de Michaelis-Menten, complétez le tableau de données cinétiques sachant que K_m est égal à 1.10^{-3} M :

Substrat (mM)	Vitesse initiale ($\mu\text{M}/\text{min}$)
0,5	50
1	
2	
3	
10	

Exercice n° 2 :

On a étudié les paramètres cinétiques de la ribonucléase T_1 et de trois enzymes obtenues par mutagenèse dirigée, en utilisant comme substrat un dinucléotide, le **pGpC**. L'enzyme native est caractérisée par une constante de vitesse catalytique égale à 75700 min^{-1} et une constante de Michaelis de 0.54 mM . La mutagenèse dirigée a permis de changer l'acide glutamique situé en position 58 en aspartate (Asp-58), en glutamine (Gln-58) ou en alanine (Ala-58).

Le tableau donne les vitesses d'hydrolyse du substrat, exprimée en $\mu\text{M}/\text{min}$, pour différentes concentrations de substrat et aux concentrations d'enzymes modifiées indiquées :

	[pGpC] (mM)				
	0.135	0.2	0.33	0.5	1
5.4 nM de Asp-58	7.6	10.1	13.8	17.1	22.3
9 nM de Gln-58	2.35	3.2	4.4	5.5	7.4
9 nM de Ala-58	4.2	5.1	6.2	7	8

Pour les trois enzymes, déterminez les valeurs :

1. Des constantes de Michaelis.
2. Des vitesses maximales.
3. Des constantes de vitesse catalytiques.

Exercice n° 3 :

L'action d'une déshydrogénase qui possède le NAD^+ comme coenzyme peut être schématisée de la façon suivante :



La cinétique de réduction de **X** en présence de NADH,H^+ à 0,12mM (concentration très saturante pour l'enzyme) a été étudiée à différentes concentrations de **X** et en présence d'enzyme à 0,1 μM . On a suivi la diminution de l'absorbance à 340nm, due à l'oxydation du NADH,H^+ (sachant que le coefficient d'extinction molaire du NADH,H^+ : $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; le NAD^+ est transparent à cette longueur d'onde) :

[X] (mM)	Absorbance mesurée au temps				
	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
1	0,66	0,57	0,48	0,39	0,3
0,5	0,665	0,585	0,505	0,42	0,34
0,2	0,685	0,62	0,555	0,495	0,43
0,1	0,7025	0,655	0,61	0,565	0,525
0,05	0,72	0,69	0,6625	0,6375	0,6025

Sachant que la loi qui lie l'absorbance à la concentration est celle de Beer-Lambert : $A = \epsilon.l.C$ ($l = 1\text{cm}$), déterminer :

1. La vitesse initiale de la réaction (en $\mu\text{M}.\text{min}^{-1}$) pour chaque concentration de substrat **X**.
2. La constante de Michaelis de **X** et la vitesse maximale de la réaction.

Exercice n° 4 :

La déshydrogénation du glucose par la notatine (glucose oxydase : E.1.1.3.4) (enzyme présente chez *Penicillium notatum*) correspond à la réaction suivante :



On détermine les vitesses de la réaction en mesurant les volumes d' O_2 gazeux consommés par une série de solutions contenant 1 mg d'enzyme pure par mL et différentes concentrations de glucose. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

Concentration en glucose des différentes mélanges réactionnels (mg/mL)	0,9	1,8	3,6
Volume d' O_2 consommé par mL de mélange réactionnel et par minute (mL)	0,415	0,725	1,090

1. Déterminer graphiquement K_m (en mol.L^{-1}) et V_m (en $\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).
2. Déterminer l'activité molaire spécifique de la notatine.

Données :

- ✓ Le volume molaire de l'O₂ = 24,5 L/mol
- ✓ Poids moléculaire (notatine) = 152000 Da
- ✓ Masse molaire (glucose) = 180 g/mol

Exercice n° 5 :

La lactase (β -galactosidase) (EC.3.2.1.23) hydrolyse le lactose en glucose et galactose. On détermine la vitesse d'hydrolyse du lactose par la lactase dans des conditions initiales. Il apparaît $0,672 \times 10^{-2}$ moles de glucose en 10 minutes. On a introduit dans le milieu 1mL de la solution enzymatique.

La teneur en protéines de cette solution est de 2,85 g/L.

1. Calculer la concentration d'activité catalytique de la préparation enzymatique en (kat/mL) et en (U/mL).
2. Calculer l'activité spécifique de l'enzyme en (kat/mg) et en (U/mg).
3. Calculer l'activité molaire spécifique de l'enzyme.

Donnée : $M_{lactase} = 135000 \text{ Da}$