

## CINETIQUE ENZYMATIQUE

**Exercice 1 :**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse des esters de l'acide ortho-phosphorique. Pour suivre l'activité enzymatique, on utilise un substrat synthétique, le paranitrophénol-phosphate qui libère du paranitrophénol.

On obtient les résultats suivants :

[S <sub>0</sub> ] (M)	0	0,26	0,39	0,65	1,50	1,95	3,80
v <sub>i</sub> (mM.min <sup>-1</sup> )	0	0,147	0,167	0,190	0,212	0,231	0,238

1- Tracez la courbe  $v_i = f([S_0])$ .

2- Déterminez les paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_M$ ) à l'aide de la représentation des doubles inverses (Lineweaver-Burk).

**Exercice 2 :**

On suit la cinétique d'hydrolyse d'un substrat, respectivement en absence d'inhibiteur et en présence d'un inhibiteur I. Les valeurs des vitesses initiales, en UA.min<sup>-1</sup>, sont les suivantes :

1. Déterminez les paramètres cinétiques  $V_{max}$ ,  $K_M$  et  $k_{cat}$  par une méthode graphique de votre choix. Les concentrations doivent être exprimées en molarité.

2. Déterminez les paramètres cinétiques  $V_{max}'$  et  $K_M'$  en présence de l'inhibiteur. Précisez le type d'inhibition et calculez la constante d'inhibition  $K_I$ .  
Données :  $[E]_0 = 1,1 \mu M$  /  $\epsilon_M^{produit} = 2300 M^{-1}.cm^{-1}$  /  $l = 1 cm$  / UA = unité d'absorbance

[S <sub>0</sub> ] (mM)	Sans I	[I <sub>0</sub> ] (3 $\mu M$ )
25 10 <sup>-2</sup>	6,6	3,6
50 10 <sup>-2</sup>	11	6,6
100 10 <sup>-2</sup>	16,4	11
25 10 <sup>-1</sup>	23,6	18,2
50 10 <sup>-1</sup>	27,6	23,6
100 10 <sup>-1</sup>	30	27,6

**Exercice 3 :**

On dispose d'une molécule M dont on veut préciser le rôle dans une réaction catalysée par une enzyme :

Substrat + M -----> produit(s)

On mesure la vitesse initiale de cette réaction (exprimée en nM.min<sup>-1</sup>) pour différentes concentrations de S, en présence ou non de la molécule M (à la concentration indiquée dans le tableau suivant).

D'après les résultats de ce tableau, déterminez si la molécule M est un inhibiteur : dans ce cas, déterminez le type d'inhibition et calculez la valeur de la constante  $K_I$ .

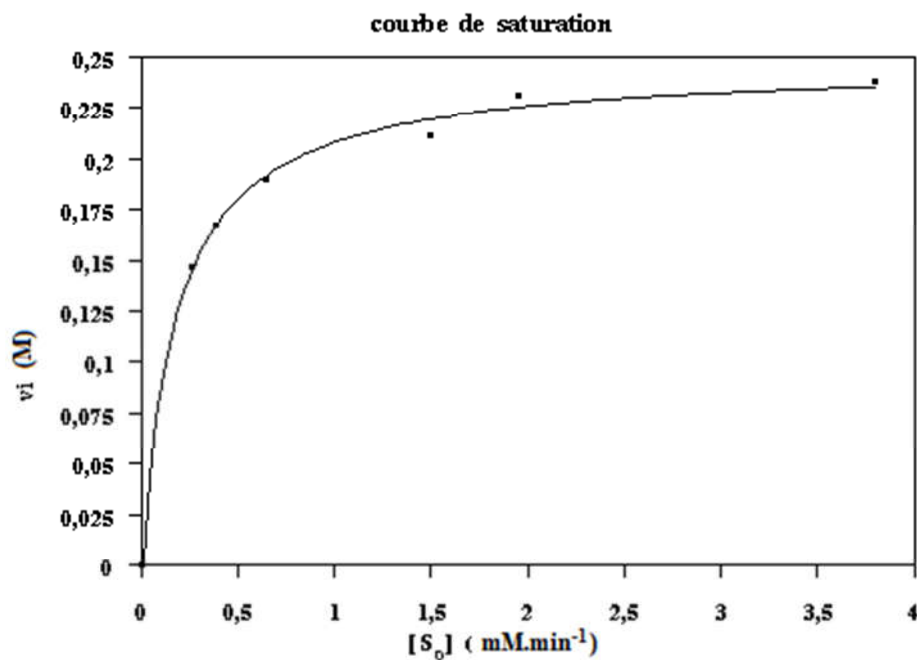
[S <sub>0</sub> ] ( $\mu M$ )	[molécule M] (mM)		
	0	1	2,84
1	3,8	2,7	1,7
2	6	4,2	2,6
5	9	6,2	4,1
10	10,5	7,7	4,8

## Correction TD n°2

## CINETIQUE ENZYMATIQUE

## Exercice 1 :

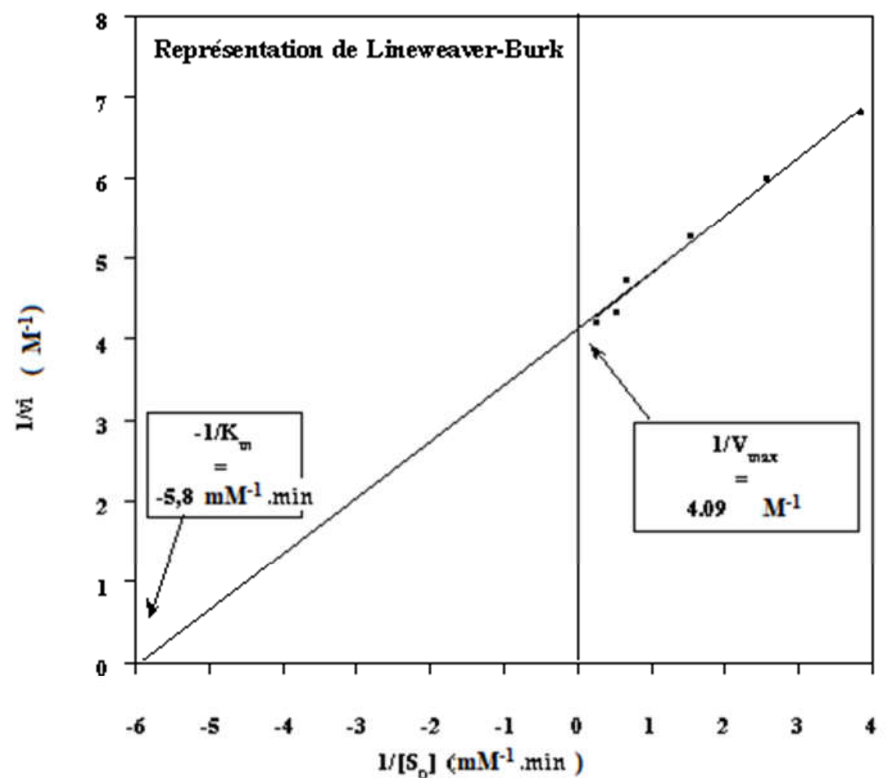
1-



2-

Les valeurs des paramètres cinétiques déterminées d'après la représentation de Lineweaver-Burk sont :

- $1/V_{\text{Max}} = 4,09 \text{ M}^{-1}$
  - $-1/K_M = -5,8 \text{ mM}^{-1}.\text{min}$
- Donc :
- $V_{\text{Max}} = 0,24 \text{ M}$
  - $K_M = 0,17 \text{ mM.min}^{-1}$



### Exercice 2 :

1- Selon la représentation de Lineweaver-Burk :

Burk : en absence d'inhibiteur

On a  $1/V_m = 0.03 \text{ UA}^{-1} \cdot \text{min}$ ,

$K_m = 1 \text{ mM}$

$V_m = 33.3 \text{ UA} \cdot \text{min}^{-1}$

Et selon la relation  $\frac{\Delta A}{\Delta t} (\text{UA} \cdot \text{min}^{-1}) =$

$V_m (\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot \epsilon \cdot l$ , donc :

$$1/V_m = 0.03 \times 2.3 \times 1 = 0.069 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}$$

$$V_m = 33.3 / 2.3 \times 1 = 14.47 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$$

On a  $V_m = K_{cat} \cdot [E_0]$

$$K_{cat} = V_m / [E_0]$$

$$K_{cat} = 14.47 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1} / 1.1 \mu\text{M}$$

$$= 14.47 \text{ mM} / (60 \text{ s} \times 1.1 \times 10^{-3} \text{ mM})$$

$$= 219.24 \text{ s}^{-1}$$

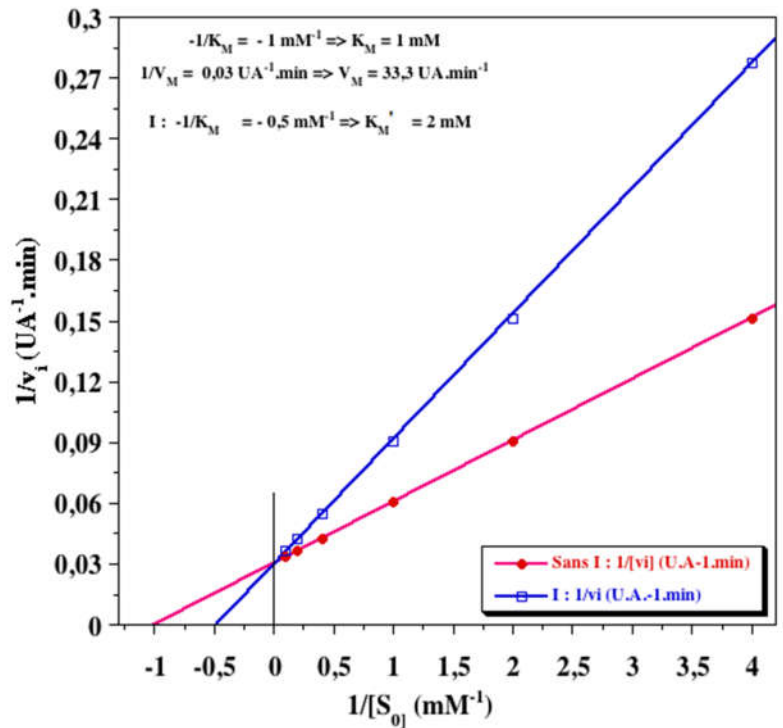
2- Selon la représentation de Lineweaver-Burk : en présence d'inhibiteur

$K_m' = 2 \text{ mM}$  et  $V_m' = V_m = 14.47 \text{ mM}$

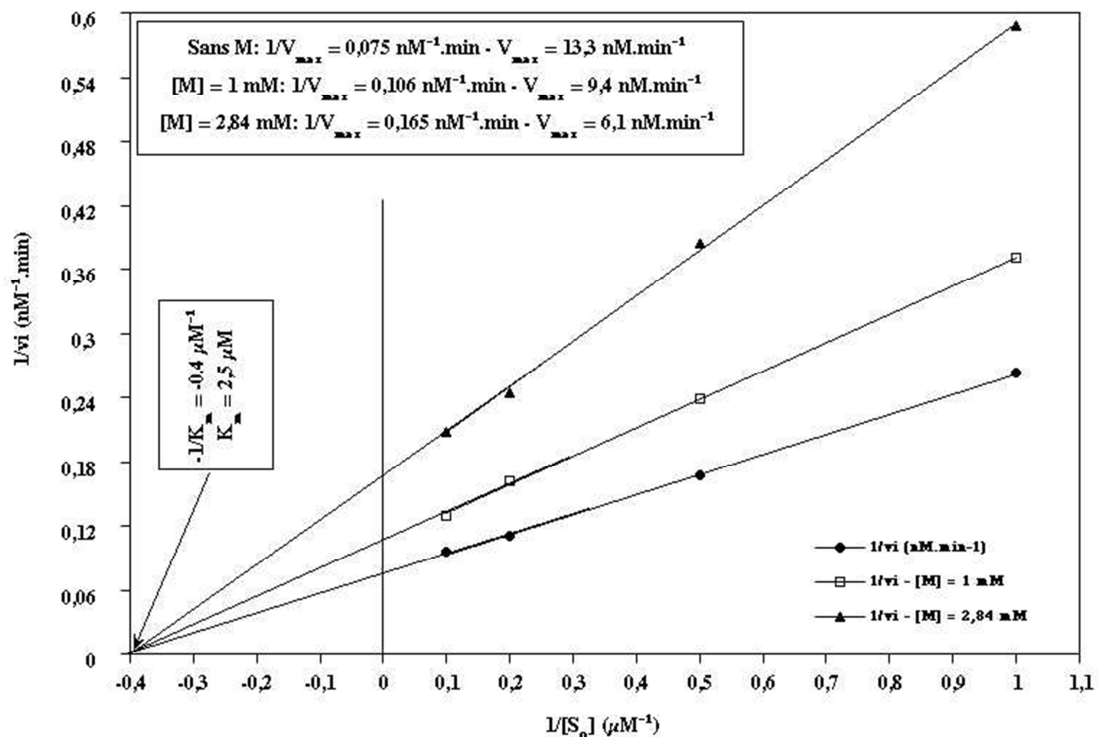
$V_{\text{Max}} = V_{\text{Max}}'$  et  $K_M \neq K_M'$ , Il s'agit donc d'un inhibiteur compétitif

A partir des valeurs déterminées graphiquement, on calcule :  $K_I$

On a  $K_m' = K_m (1 + [I_0] / K_I)$ , donc  $K_I = (K_m \times [I_0]) / (K_m' - K_m) = (1 \times 3) / (2 - 1) = 3 \mu\text{M}$



### Exercice 3



$V_{\text{Max}} \neq V_{\text{Max}}'$  et  $K_M = K_M'$ , il s'agit d'un inhibiteur **non** compétitif.

A partir des valeurs du graphique :  $K_I = (V_{\text{max}}' \times [I_0]) / (V_{\text{max}} - V_{\text{max}}') \Rightarrow K_I = 2.41 \text{ mM}$