

TD B15 Corona – Enzymologie

Eléments de correction

I. Etude de la vitesse d'une enzyme en fonction du temps

1. Loi de Beer-Lambert et la mesure de l'absorbance

- **Q1. On note M_{amidon} la masse d'une mole de glucose polymérisée sous forme d'amidon. Montrez que $M_{\text{amidon}} = 162 \text{ g.mol}^{-1}$. On rappelle les masses molaires de l'oxygène, du carbone et de l'hydrogène : $M(\text{O}) = 16 \text{ g.mol}^{-1}$, $M(\text{C}) = 12 \text{ g.mol}^{-1}$, $M(\text{H}) = 1 \text{ g.mol}^{-1}$.**

*Le glucose est un monomère de l'amidon. La formation de la liaison osidique est, on le rappelle, une **condensation**, et libère donc de l'eau. Si la formule d'un glucose est $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, celle d'un monomère de glucose sous forme d'amidon est donc $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$. Sa masse molaire est donc : $M_{\text{amidon}} = 6 M(\text{C}) + 10 M(\text{H}) + 5 M(\text{O}) = 162 \text{ g.mol}^{-1}$.*

2. Préliminaires : la solution non absorbante de référence et la solution étalon

a) Solution non absorbante de référence

- **Q2. Justifiez que l'on prendra ici comme référence de l'eau distillée sans amidon et contenant du lugol.**

*La solution d'amidon étudiée contient du lugol et de l'amidon ; les espèces absorbantes sont donc a priori l'amidon coloré par le lugol **ET** le lugol lui même. On doit donc mettre du lugol dans la solution non absorbante de référence, de façon à faire en sorte que **le seul paramètre variant entre solution non absorbante et solution d'amidon soit la présence ou non d'amidon**.*

b) Solutions étalons

- **Q3. Pour chaque solution S1 à S8, déterminez la concentration molaire d'amidon (C), et complétez le tableau suivant.**

Soient C_0 la concentration massique d'amidon de la solution mère, V_0 le volume prélevé dans la solution mère et V_t le volume total de la cuve. $C_0 = 5 \text{ g.L}^{-1}$; $V_t = 3 \text{ mL}$; V_0 varie selon la solution (de 0,2 mL à 1,6 mL). La concentration d'amidon nous est alors donnée par la relation :

$$C = \frac{C_0 \times V_0}{M_{\text{amidon}} \times V_t}$$

On veillera à bien respecter les unités. L'application numérique donne :

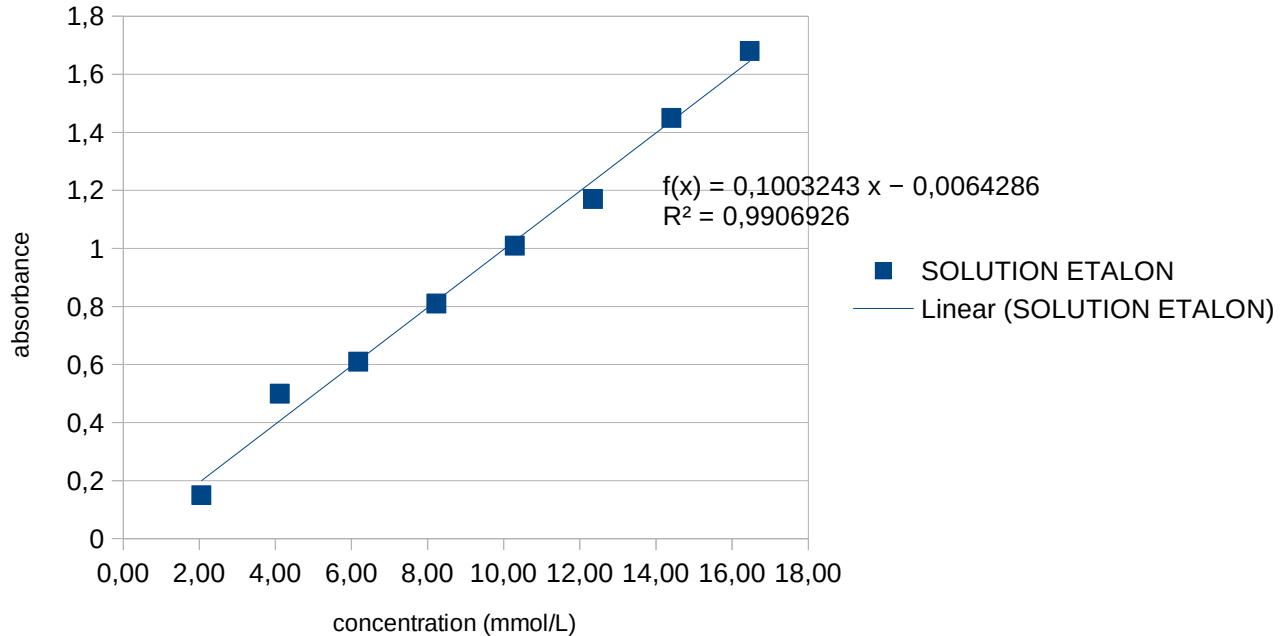
solution	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
C (mmol.L ⁻¹)	2,06	4,12	6,17	8,23	10,29	12,35	14,4	16,46

- **Q4. Déterminez un moyen permettant de calculer $\epsilon_\lambda \times L$ et mettez-le en œuvre.**

Pour chaque solution, on a à la fois sa concentration molaire et son absorbance. On rappelle la relation

entre concentration et absorbance : $A = \epsilon_{\lambda} C L$. Il s'agit d'une **loi linéaire**. Il suffit donc de construire le graphe de A en fonction de C, et de faire une régression linéaire pour déterminer le coefficient directeur $\epsilon_{\lambda} \times L$.

Absorbance en fonction de la concentration en amidon



La régression linéaire nous donne le coefficient directeur : $\Rightarrow \epsilon_{\lambda} \times L = 0,1003243 \text{ mmol}^{-1} \cdot L$

On notera que le coefficient de corrélation est correct, sans être excellent. Il faudrait refaire cette manipulation plusieurs fois de façon à augmenter la précision de ce coefficient.

3. Mesures de la vitesse de la réaction en fonction du temps

a) Détermination de la vitesse en fonction du temps

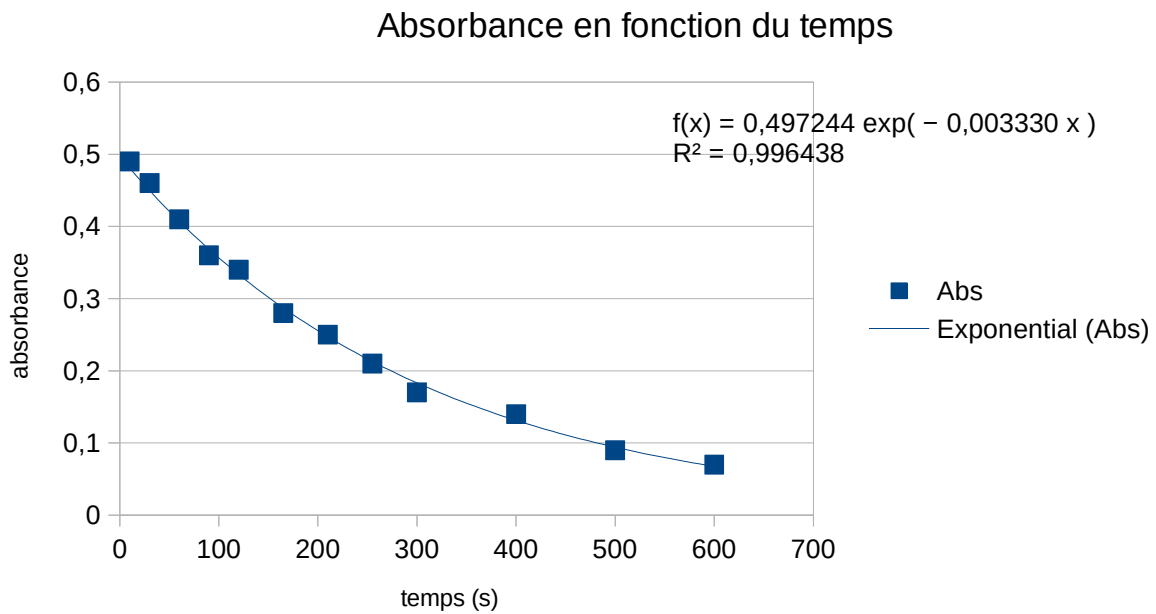
- **Q5. Justifiez que $v = -\frac{1}{2\epsilon_{\lambda} L} \frac{dA}{dt}$, avec v la vitesse de la réaction, ϵ_{λ} l'absorptivité et L la longueur de la cuve.**

Chaque maltose est composé de deux molécules de glucose liées entre elles par une liaison osidique, donc l'apparition d'une mol de maltose se traduit par la disparition de 2 mol d'amidon (ou 2 mol de glucose sous forme d'amidon), donc $v = \frac{d[\text{maltose}]}{dt} = -\frac{1}{2} \frac{dC}{dt}$

Or $A = \epsilon_{\lambda} L C$ donc $C = \frac{A}{\epsilon_{\lambda} L}$ donc $\frac{dC}{dt} = \frac{1}{\epsilon_{\lambda} L} \frac{dA}{dt}$

D'où :
$$v = -\frac{1}{2} \frac{dC}{dt} = -\frac{1}{2\epsilon_{\lambda} L} \frac{dA}{dt}$$

- **Q6. Tracez le graphe de l'absorbance en fonction du temps, et déduisez-en une méthode de calcul de vitesses de réaction en fonction du temps.**



Comme la vitesse est une fonction linéaire de la dérivée temporelle de l'absorbance, on peut (en théorie), en tout point, déterminer la dérivée de l'absorbance par rapport au temps. Pour plus de commodité, on a lissé la courbe grâce à une courbe de tendance de type exponentielle, qui donne un coefficient de corrélation convenable. De là, on peut utiliser l'une des trois méthodes pour calculer les dérivées de l'absorbance :

1. Méthode numérique locale

Pour chaque triplet de temps consécutifs t_1 , t_2 et t_3 , on définit un temps t_m étant la moyenne des trois temps. On calcule le taux d'accroissement de l'absorbance, qui approche $\frac{dA}{dt}$, en calculant $\frac{A_3 - A_1}{t_3 - t_1}$. On a une approximation du résultat, qui est cependant assez mauvaise, surtout si les points de mesures sont assez distants et si les incertitudes sont grandes (c'est le cas ici).

2. Méthode graphique

On trace, à la main, quelques tangentes (le plus sera le mieux), par exemple toutes les 50 s. On détermine ensuite le coefficient directeur de chaque tangente, qui donne une approximation de $\frac{dA}{dt}$. Cette méthode est peu précise, mais bien plus que la méthode numérique, car elle prend en compte un lissage (bien qu'artisanal) de la courbe.

3. Méthode analytique

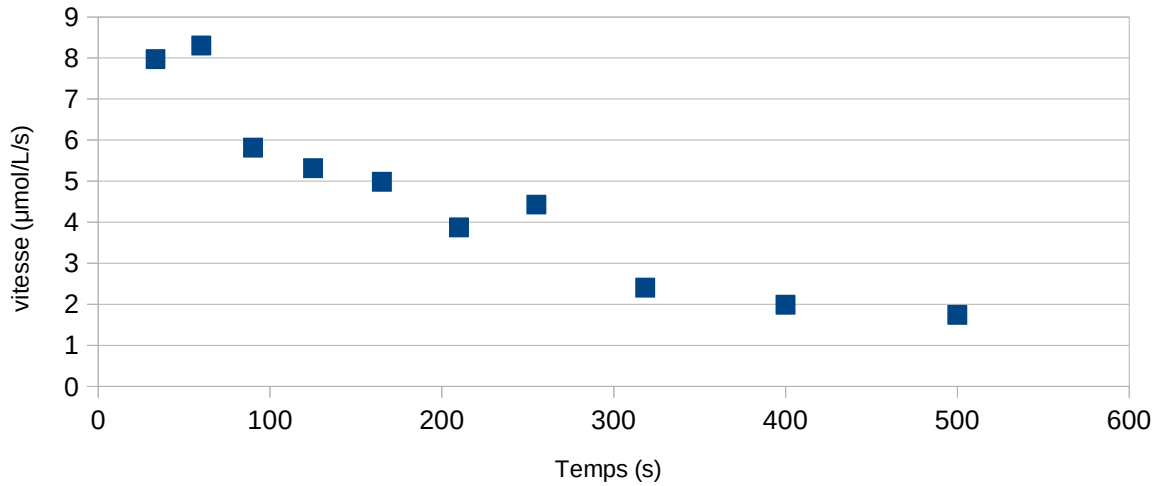
A partir de la courbe de tendance de type exponentielle, on récupère l'expression de l'absorbance, que l'on dérive analytiquement. Ici, on a $A = a e^{bt}$ avec $a = 0,497244$ et $b = - 0,003330$. On a donc $\frac{dA}{dt} = ab e^{bt}$. On en détermine quelques valeurs, toujours toutes les 50 s, par exemple. Cette méthode est la plus précise, mais elle nécessite d'avoir des données qui vérifient effectivement une loi exponentielle simple. C'est le cas ici. On notera (question suivante) que les deux courbes de la méthode graphique (100 % pratique, aucune modélisation) et de la méthode analytique (100 % modélisation) se superposent quasiment

complètement.

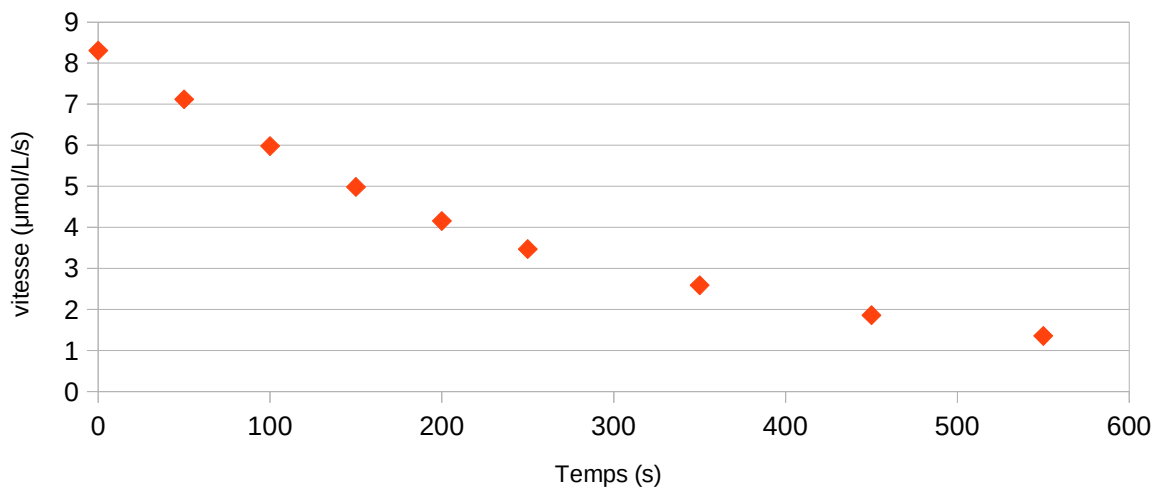
➤ **Q7. Tracez le graphe de v en fonction du temps.**

On a tracé un graphe correspondant à chaque méthode.

Vitesse en fonction du temps
(méthode numérique locale)

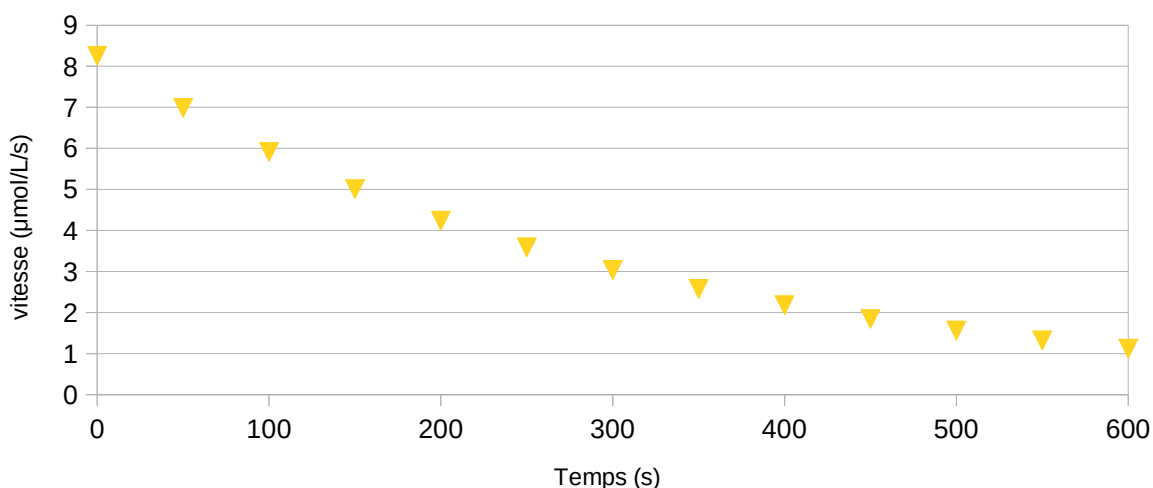


Vitesse en fonction du temps
(méthode des tangentes "à la main")



Vitesse en fonction du temps

(méthode analytique)



➤ **Q8. Commentez le résultat de la question précédente.**

On note que la vitesse **décroit** au cours du temps, en raison de la diminution de la concentration en substrat (et peut-être aussi, comme c'est souvent le cas, en raison d'une inhibition par le produit de la réaction). C'est la raison pour laquelle l'étude de la vitesse au cours du temps ne peut pas être utilisée pour décrire une enzyme : on utilisera par la suite la vitesse initiale v_i , soit la vitesse **en tout début de réaction**, lorsque la concentration en produit et la diminution de la concentration en réactif sont négligeables.

II. Etude de la vitesse initiale d'une enzyme en fonction de la concentration en substrat

La même enzyme va être utilisée ici. On va étudier la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale en substrat afin de savoir si l' α -amylase de blé est une enzyme michaelienne ou non-michaelienne. On va pour cela utiliser cinq concentrations différentes en amidon, obtenues par des dilutions de la solution-mère à 5 g.L⁻¹.

➤ **Q9. Complétez le tableau suivant.**

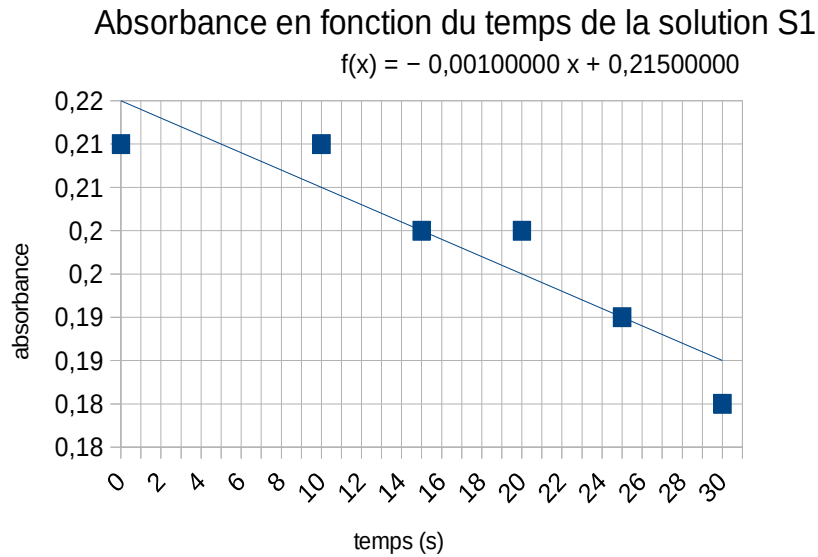
On utilise toujours la même relation que dans la question Q3 :
$$C = \frac{C_0 \times V_0}{M_{\text{amidon}} \times V_t} .$$

	volume				
solution	S1	S2	S3	S4	S5
concentration en amidon (mmol.L ⁻¹)	2,06	4,63	7,20	9,77	12,35

➤ **Q10. Déterminez la vitesse initiale v_i pour chacune des cinq solutions. L'amylase semble-t-elle michaelienne ?**

On détermine la vitesse initiale en faisant l'approximation que pendant les premières secondes de la manipulation, la courbe peut être assimilée à une droite. On a alors le choix entre une régression linéaire ou une droite de tendance à la main, dont on déterminerait le coefficient directeur. La régression linéaire peut être réalisée si on dispose des données chiffrées. Si les courbes sont données, on préférera le traçage à la main d'une droite.

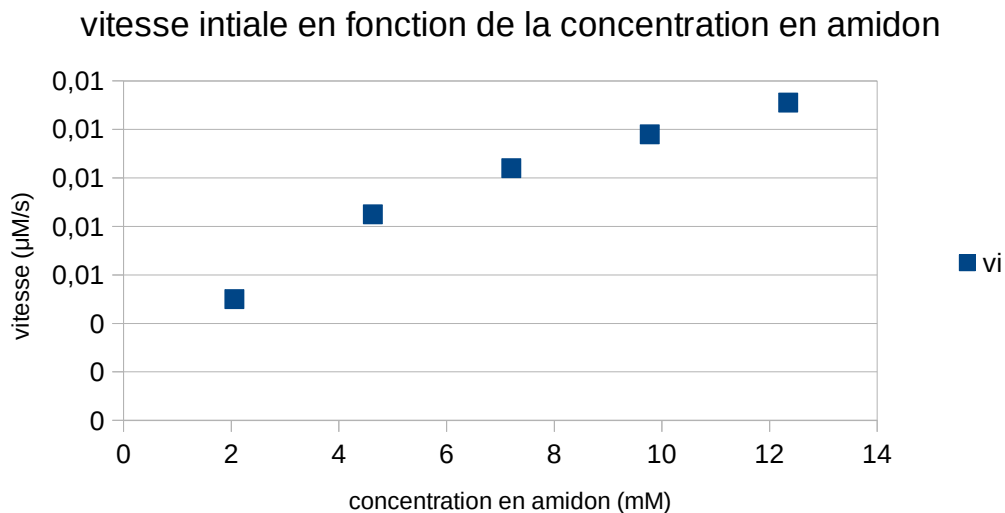
Sur la première solution, on a tracé la droite de régression linéaire et affiché l'équation, dont le coefficient directeur nous permet de calculer la vitesse de la réaction.



On procède ainsi pour l'ensemble des 5 solution, ce qui nous donne le résultat suivant :

<i>solution</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>
<i>concentration en amidon (mM)</i>	<i>2,06</i>	<i>4,63</i>	<i>7,20</i>	<i>9,77</i>	<i>12,35</i>
<i>vitesse initiale ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)</i>	<i>5,5</i>	<i>9,0</i>	<i>11,1</i>	<i>12,4</i>	<i>13,4</i>

On construit le graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration :



On constate que vitesse augmente constamment, mais la pente (a dérivée de la vitesse) diminue régulièrement (autrement dit, la courbe n'est pas sigmoïde) : l'amylose **semble** donc michaélienne. Il faudrait cependant pour le démontrer placer les points dans un diagramme de $1/v_i$ en fonction de $1/C$ (représentation en double inverse de Lineweaver-Burk). Et il est illusoire de chercher à déterminer K_M ou v_{max} avec la représentation classique de v_i en fonction de C .

- **Q11. Tracez le graphe donnant $\frac{1}{v_i}$ en fonction de $\frac{1}{C}$ et montrez que l'amylose est michaélienne. Déterminez le K_M et la v_{max} de la solution d'amylose.**

On donne ce graphe ci-dessous. Les points sont remarquablement alignés, avec un coefficient de 0,9996, ce qui est excellent sachant que nous n'avons que 5 points. Donc la cinétique de l'enzyme vérifie bien l'équation $v_i = \frac{v_{max}C}{K_M + C}$: elle est donc bien michaélienne. Ses paramètres cinétiques peuvent être déterminés de deux façons :

1. Méthode graphique

En représentation de Lineweaver-Burk, on a vu en cours que l'ordonnée à l'origine donnait $1/v_{max}$, et que l'abscisse du point d'intersection entre l'axe des abscisses et la droite donnait $-1/K_M$. On lit sur le graphe :

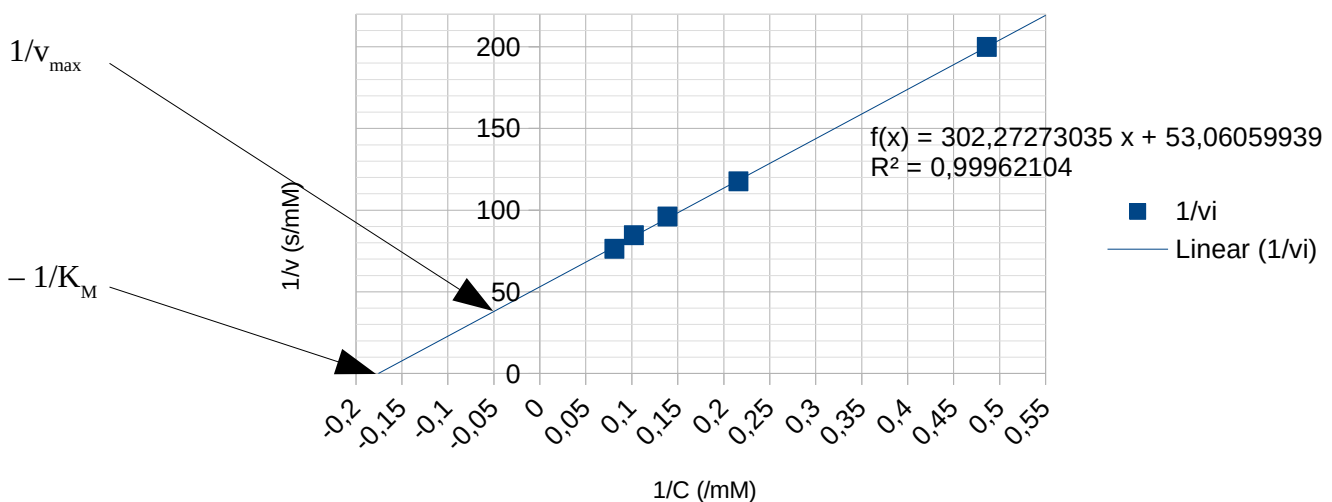
- $1/v_{max} = 54 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}$, donc $v_{max} = 0,0185 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 18,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 18,5 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$.
- $-1/K_M = -0,175 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ donc $K_M = 5,71 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} = 5,71 \text{ mM}$.

2. Méthode analytique

On peut se servir de la régression linéaire, sachant que $\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{max}} \times \frac{1}{C} + \frac{1}{v_{max}}$.

- L'ordonnée à l'origine ($b = 53,06059939$) vaut $1/v_{max}$, et on a donc $v_{max} = 18,8464 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est très proche du résultat trouvé par la méthode graphique.
- Le coefficient directeur ($a = 302,27273035$) vaut K_M/v_{max} , et on a donc $K_M = a v_{max} = 5,6967 \text{ mM}$, ce qui est très proche du résultat trouvé par la méthode graphique.

Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk des résultats



III. Les hexokinases : exploitation de données cinétiques et structurales

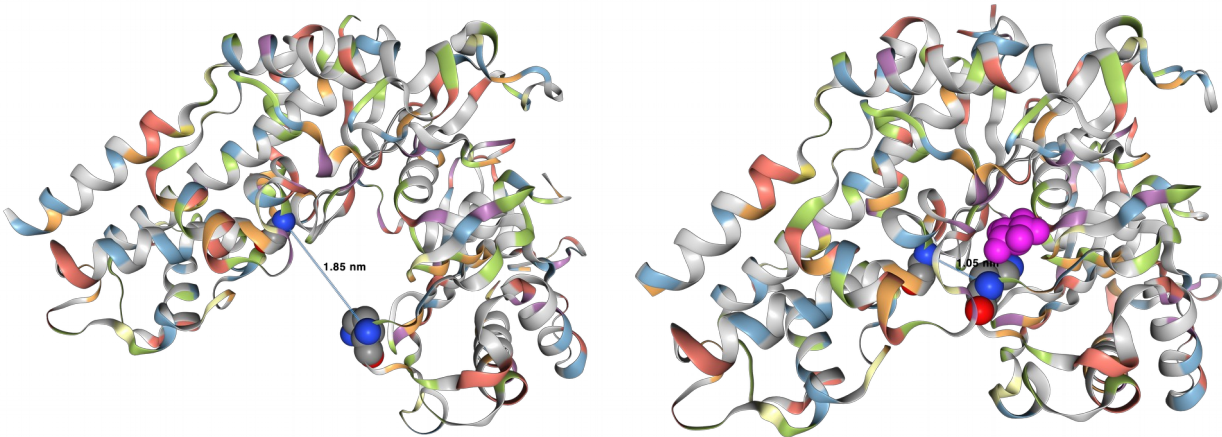
➤ Q12. Justifier le nom *hexokinase*.

Une *kinase* est une phosphoryl-transférase, qui permet la phosphorylation d'une molécule organique depuis un ATP. Ici, on a bien une phosphorylation de glucose à partir d'ATP : c'est bien une kinase.

La racine *hexo* signifie « six » en grec. Le glucose est un *hexose*, c'est-à-dire un sucre à 6 carbones. L'*hexokinase* tire son nom du fait qu'elle peut phosphoryler tout hexose, et notamment le glucose.

1. Analyse structurale

➤ Q13. Traitez les deux molécules de façon à montrer que la fixation du substrat sur l'enzyme implique un ajustement induit. On attend des mesures de distance, et une mise en évidence explicite du substrat. La réponse à la question sera donnée sous la forme de deux images permettant la comparaison des deux situations (avec ou sans substrat).



On a représenté la protéine en rubans, laissant apparaître les hélices et feuilletts. Le glucose (substrat) a été coloré en rose (droite). Afin de montrer le changement de conformation, on a identifié deux acides aminés particuliers (mais on aurait pu en choisir d'autres) : la glycine 320 et la lysine 195. On a déterminé la distance entre les deux atomes d'azote de la liaison peptidique sans substrat (gauche : 1,85 nm) et avec substrat (droite : 1,05 nm). Ces deux acides aminés se sont donc rapprochés de 0,80 nm, ce qui est considérable à cette échelle. Ce changement de conformation, induit par le substrat, correspond donc à l'**ajustement induit**. Il permet à l'enzyme d'englober le substrat, qui se retrouve emprisonné dans le site actif.

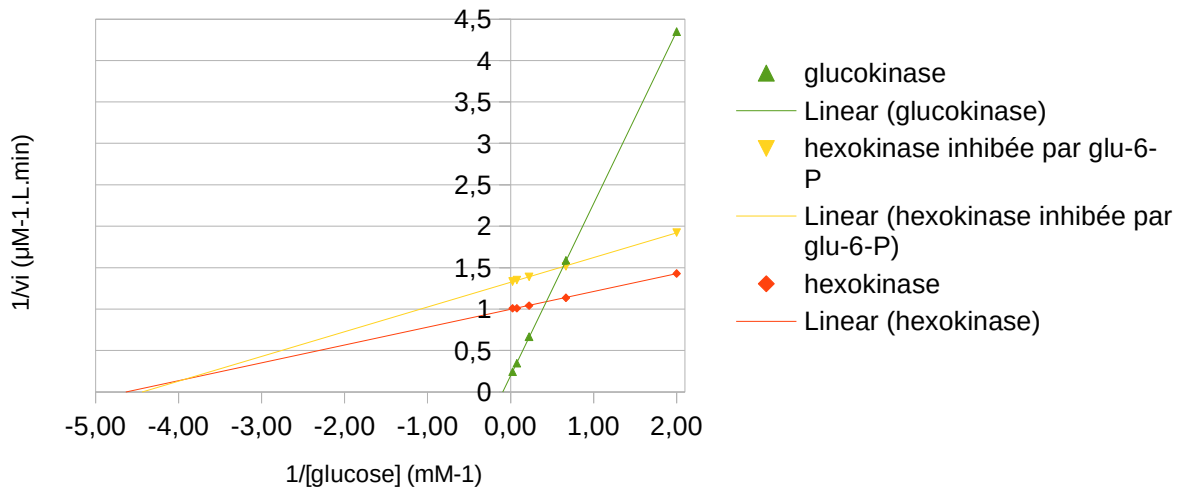
2. Caractéristiques cinétiques et inhibition

➤ Q14. Montrez que la glucokinase et l'hexokinase sont michaéliennes*, et déterminez leur K_M et leur v_{max} .

On construit directement le graphe de $1/v_i$ en fonction de $1/[glucose]$, qui seul permet de démontrer (par une régression linéaire) les caractéristiques de la cinétique.

Les points sont alignés, et les deux enzymes (glucokinase et hexokinase) sont donc michaélienne.

Représentation double inverse de la cinétique de l'hexokinase (inhibée ou non) et de la glucokinase



On détermine par la méthode de son choix (graphique ou analytique) K_M et v_{max} , et on trouve (ici par méthode analytique) :

	K_M	v_{max}
glucokinase	10,52 mM	5,1 $\mu M \cdot \text{min}^{-1}$
hexokinase	0,22 mM	1,0 $\mu M \cdot \text{min}^{-1}$

➤ **Q15. Discutez la nature de l'inhibition (compétitive ou non) par le glu-6-Ⓢ.**

On exploite le même graphe. On constate qu'en présence de glu-6-Ⓢ, la pente de la courbe est plus grande que sans glu-6-Ⓢ. Donc K_M/v_{max} est plus grand, donc soit K_M est plus grand, soit v_{max} est plus petit, soit les deux. Dans un cas comme dans l'autre, l'enzyme est moins active. Le glu-6-Ⓢ est donc bien un inhibiteur.

- De plus, on constate que K_M n'est pas modifié (l'intersection entre les courbes et l'axe des abscisses donne la valeur de $-1/K_M$).
- En revanche, $1/v_{max}$ est augmentée, donc v_{max} est diminué par l'inhibition. Donc l'inhibition est **non compétitive**.

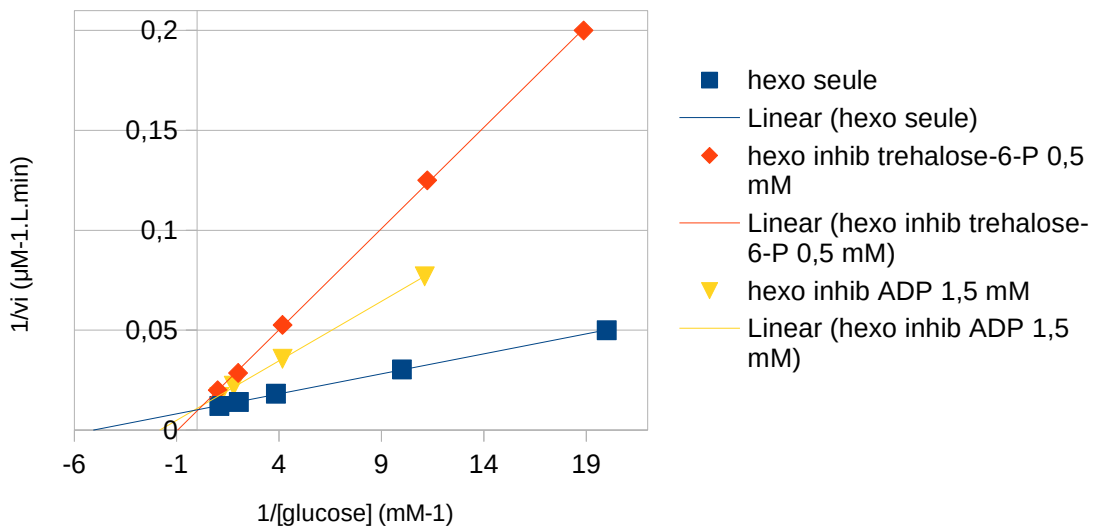
➤ **Q16. Sachant la formule du glu-6-Ⓢ, pouvait-on s'attendre à une telle inhibition ?**

Il est difficile de prévoir une inhibition **non compétitive**. On rappelle que l'inhibiteur, dans ce cas, se fixe sur un site autre que le site actif de l'enzyme. En revanche, la similitude entre le substrat (le glucose) et l'inhibiteur (le glu-6-Ⓢ) aurait plutôt pu laisser penser que l'inhibition était compétitive. On retiendra que l'analyse préalable de la structure de l'inhibiteur permet de formuler des **hypothèses** sur la nature de l'inhibition et sur son mode d'action, mais elle n'a pas valeur de preuve.

➤ **Q17. Par un traitement graphique adéquat, discutez la nature de l'inhibition par le tréhalose et l'ADP.**

On se trouve ici dans le cas contraire : la valeur de v_{max} ne change pas, mais les valeurs de $-1/K_M$ augmentent avec l'inhibition, donc les valeurs de K_M augmentent. Donc l'inhibition est **compétitive**.

Représentation double inverse de la cinétique de l'hexokinase de levure inhibée ou non



➤ **Q18. Donnez une interprétation biochimique de cette inhibition grâce au document 3.**

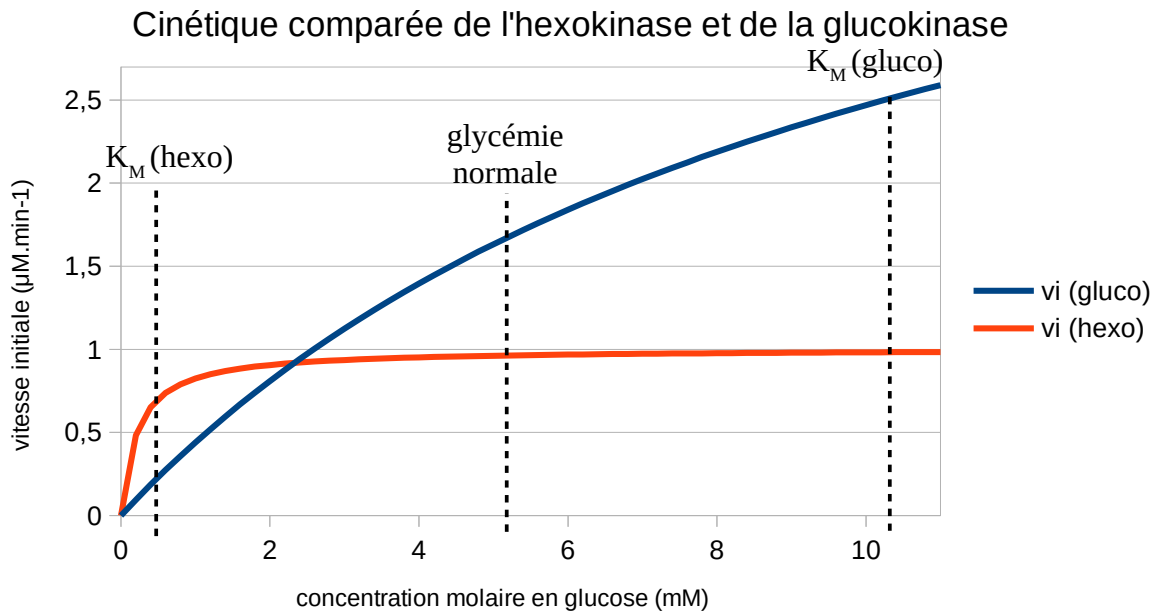
- L'ADP est structuralement très proche de l'ATP ; or, l'ATP est un des deux substrats de l'enzyme. Donc il est vraisemblable que l'ADP se fixe au niveau du site actif (inhibition compétitive) à la place de l'ATP, empêchant donc l'ATP de s'y fixer lui-même.
- De même, on constate que le tréhalose n'est autre qu'un dimère α1-α1 de glucose, qui peut donc probablement se fixer sur le site actif de l'enzyme à la place du glucose.

3. La place des hexokinase dans la physiologie des mammifères

- **Q19. Sachant cela, quel peut être l'intérêt pour l'organisme de posséder deux enzymes catalysant la même réaction, mais avec des K_M et v_{max} différents ?** (rappel : ils ont été calculés à la question Q15).

On va commencer par calculer la valeur de la glycémie molaire g_{mol} à partir de la glycémie massique g_{mass} . La masse molaire du glucose est $M = 180 \text{ g.mol}^{-1}$. Donc $g_{mol} = \frac{g_{mass}}{M}$.

AN = $g_{mol} = 0,056 \text{ mol.L}^{-1} = 5,6 \text{ mmol.L}^{-1} = 5,6 \text{ mM}$. On constate que cette valeur correspond à peu près à la moitié du K_M de la glucokinase, mais qu'elle est beaucoup plus élevée que le K_M de l'hexokinase. On va donc raisonner pour des concentrations inférieures à 5 mM, puis supérieures à 5 mM. On va également tracer le graphe de la cinétique de la glucokinase et de l'hexokinase, afin de les commenter.



1. Pour des concentrations < 5 mM

Lorsque la concentration en glucose dans la cellule est très inférieure à 5 mM, **la glucokinase est très peu active**. Bien que sa v_{max} soit plus élevée que celle de l'hexokinase, on lit sur le graphique qu'il existe des concentrations (inférieures à 2 mM environ) pour lesquelles l'hexokinase est même plus active que la glucokinase. On rappelle que l'hexokinase est présente dans tous les tissus de l'organisme. Cette activité non négligeable même pour des concentrations très faibles en substrat, permet aux cellules de réaliser la glycolyse, et donc de **produire l'énergie qui leur est nécessaire** même lorsque la concentration en substrat est faible.

Un exemple s'avèrera peut être utile pour mieux comprendre cette notion. Une concentration cellulaire correspondant au K_M de l'hexokinase, soit 0,22 mM, correspond à 25 fois moins que la glycémie moyenne : cette concentration en glucose est extrêmement basse ! Malgré cela, l'hexokinase a une vitesse qui, par définition, est égale à la moitié de sa vitesse maximale, ce qui est considérable.

Cette activité adaptée aux faibles concentrations en glucose est permise par un v_{max} et un K_M petits. L'hexokinase est une **sprinteuse** : elle est rapide au démarrage (K_M petit) mais ne va loin (v_{max} petit).

Conclusion : l'hexokinase est une enzyme généraliste permettant aux cellules de réaliser la glycolyse y compris lorsque les concentrations en glucose sont faibles.

2. Pour des concentrations > 5 mM

Toutes les cellules sont irriguées le sang. Les cellules hépatiques sont très riches en perméases à glucose, notamment en transporteur GLUT2. La membrane des hépatocytes est donc très perméable au glucose, et la concentration en glucose dans le cytosol des hépatocytes est donc sensiblement identique à la concentration en glucose du plasma (ou glycémie).

Pour des valeurs de glycémie hépatique deux fois supérieures à la glycémie normale (par exemple, après un repas très riche en sucres), la glycémie sera donc de 11 mM, soit environ le K_M de la glucokinase. Pour cette valeur, pourtant très élevée, la glucokinase n'est, par définition, qu'à la moitié de son activité maximale.

Cependant, comme v_{\max} est 5 fois plus élevée pour la glucokinase que pour l'hexokinase, même à 50 % de son activité, elle est tout de même 2,5 fois plus efficace que l'hexokinase (qui a presque atteint sa v_{\max}), et sa vitesse continue de croître avec la concentration en glucose. On en déduit que la glucokinase, pour des concentrations égales ou supérieures à la glycémie normale, est beaucoup plus active que l'hexokinase, et permet donc une transformation massive de glucose en glucose-6-P, ce qui permet de stocker le glucose sous forme de glycogène, et donc de diminuer la glycémie.

Cette activité adaptée à la concentration en glucose est permise par un v_{\max} et un K_M grands. La glucokinase est une **marathonienne** : elle est lente au démarrage (K_M grand) mais va loin (v_{\max} grand)

Conclusion : la glucokinase est une enzyme très spécialisée impliquée dans la régulation de la glycémie par les hépatocytes.

- **Q20. On a montré que l'ADP et le glu-6-P inhibaient tous deux l'hexokinase. En quoi cette inhibition permet-elle une régulation de l'activité de cette enzyme ?**

L'ADP et le glu-6-P sont les produits de l'enzyme. On parle ici d'inhibition par excès de produit. C'est un mode d'autorégulation qui permet d'activer l'enzyme en fonction non pas de la concentration en réactifs, mais de la **balance produits/réactifs**. Cela permet de conserver une quantité de produits plus ou moins constante dans la cellule :

- Un excès de réactifs, en plus de déplacer l'équilibre vers la droite (contrôle thermodynamique) accélère la consommation de ces réactifs (contrôle cinétique).
- Un excès de produits, en plus de déplacer l'équilibre vers la gauche (contrôle thermodynamique) ralentit la production de ces produits (contrôle cinétique).

L'inhibition par excès de produit est un mode extrêmement courant de régulation de l'activité enzymatique, et elle est un des fondements biochimiques de l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien à un niveau constant (car régulé) des paramètres du milieu interne (concentration en glucose, en acides aminés, pH...).