

TD B15 Corona – Enzymologie

(mise à jour le 7 mai)

But du TD :

- Etudier la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du temps.
- Caractériser les paramètres cinétiques d'une enzyme selon le modèle de Michaelis-Menten.
- Visualiser les modifications structurales d'une enzyme par des logiciels de visualisation moléculaire.
- Résoudre quelques problèmes classiques d'enzymologie.

Tout au long de ce TD, de nombreuses applications devront être faites grâce à l'outil informatique (notamment, traitement de données par des tableurs).

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

On propose ici d'étudier une enzyme extraite de germes de blé : l' **α -amylase**. Cette enzyme permet l'hydrolyse de l'amidon contenu dans la graine au moment de la germination. L'amidon est coloré par le lugol (eau iodée), ce qui permet de suivre la réaction par **colorimétrie** (ou étude de l'absorbance). La réaction catalysée est la suivante : $\text{amidon}_n + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{amidon}_{n-2} + \text{maltose}$.

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

La loi de Beer-Lambert donne l'absorption d'une solution en fonction de la concentration d'un soluté :

$A = \epsilon_\lambda C L$, où A est l'absorbance solution, ϵ_λ l'absorptivité molaire, C la concentration molaire, et L la longueur de la cuve utilisée pour la mesure. Le travail pratique ne pouvant pas être réalisé, on se limitera à une analyse théorique du lien entre mesure d'absorbance et calcul des vitesses de réaction, et un tableau de résultats sera étudié.

La loi de Beer-Lambert donne, en théorie, le lien entre l'absorbance d'une solution de concentration molaire donnée. Or, on sait que l'amidon ne désigne pas **une** molécule, mais des milliers de molécules différentes dont le nombre de monomères de glucose peut varier. Il paraît donc très discutable d'utiliser la loi de Beer-Lambert avec de l'amidon. On peut cependant montrer que **l'absorbance d'une solution d'amidon est proportionnelle à la concentration molaire de glucose polymérisé sous forme d'amidon**.

Exemple : une solution contenant 10 000 molécules d'amidon de 1 000 glucoses a la même absorbance qu'une solution contenant 2 000 molécules d'amidon de 5 000 glucoses.

On peut donc appliquer la loi de Beer-Lambert à l'amidon, à partir du moment où on considère que la concentration molaire C désigne en réalité **la quantité de matière de glucose polymérisé par unité de volume**. On appellera cette quantité « *concentration molaire d'amidon* » par abus de langage.

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

Par la suite, on appellera M_{amidon} la « *masse molaire de l'amidon* » par abus de langage.

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

- a) Solution non absorbante de référence

L'absorbance mesurée par les spectrophotomètres correspond au rapport entre la solution dont on cherche à

connaître la concentration et une **solution de référence sans soluté absorbant** (on parle aussi de « **blanc** »).

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

La composition du **blanc** est la suivante :

composants	volume
eau distillée	2,98 mL
lugol 1 %	20 µL
total	3 mL

b) Solutions étalons

L'absorptivité molaire ϵ_λ nous est inconnue. On va la déterminer grâce à la mesure de l'absorbance de solutions de concentrations connues. On réalise 8 solutions S1 à S8 ayant les compositions suivantes :

composants	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
sol. d'amidon (5 g.L ⁻¹)	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	0,8 mL	1,0 mL	1,2 mL	1,4 mL	1,6 mL
lugol 1 %	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
eau*	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL

*qsp = « quantité suffisante pour »

On donne la **mesure d'absorbance** pour chacune des solutions :

solution	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
absorbance	0,15	0,50	0,61	0,84	1,01	1,17	1,45	1,68

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

solution	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
C (mmol.L ⁻¹)								

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

$\Rightarrow \epsilon_\lambda \times L = \dots$

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

On cherche à tracer le graphe de la vitesse de la réaction en fonction du temps. On prendra une solution ayant les caractéristiques suivantes :

composants	volume
solution d'amidon (5 g.L ⁻¹)	400 µL
lugol 1 %	20 µL
Solution d'enzyme	100 µL
eau	qsp 3 mL

On donne ci-dessous l'enregistrement de l'absorbance en fonction du temps (le temps t = 0 correspond à l'introduction des 100 µL d'enzyme dans la solution).

temps (s)	10	30	60	90	120	165	210	255	300	400	500	600
absorbance	0,49	0,46	0,41	0,36	0,34	0,28	0,26	0,21	0,17	0,14	0,09	0,07

On notera v la vitesse de la réaction, que l'on définit comme la **vitesse d'apparition de maltose**.

- **Q5. Justifiez que** $v = -\frac{1}{2\varepsilon_\lambda L} \frac{dA}{dt}$, avec v la vitesse de la réaction, ε_λ l'absorptivité et L la longueur de la cuve.
- **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.**
- **Q7. Tracez le graphe de v en fonction du temps.**
- **Q8. Commentez le résultat de la question précédente.**

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 michaélienne ou non-michaélienne. On va pour cela utiliser cinq concentrations différentes en amidon, obtenues par des dilutions de la solution-mère à 5 g.L⁻¹.

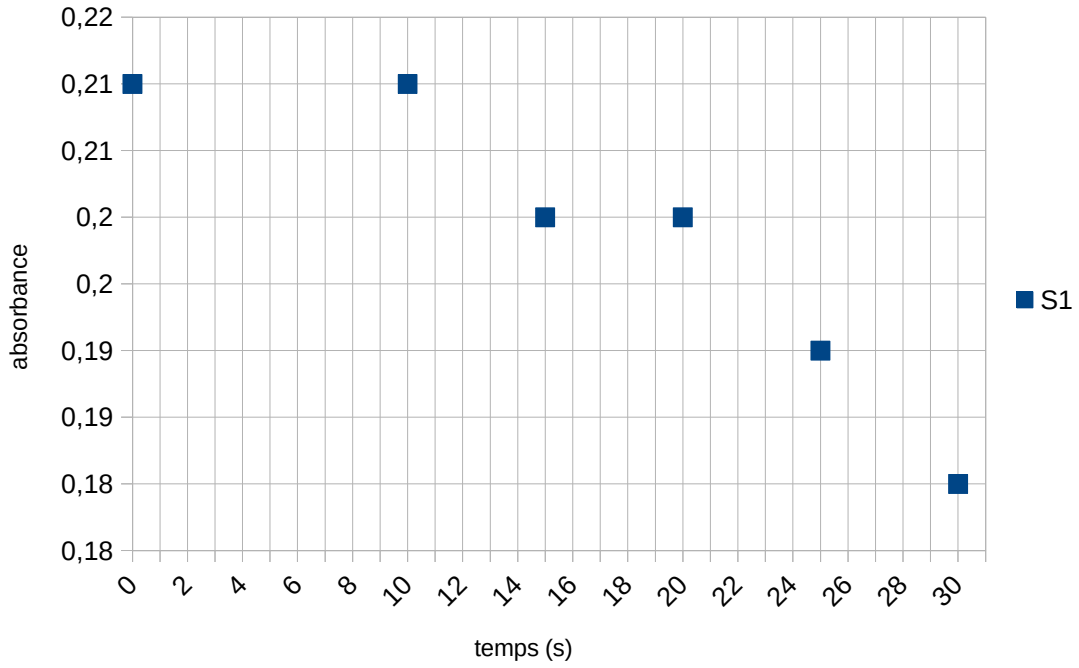
- **Q9. Complétez le tableau suivant.**

Composant	volume				
	S1	S2	S3	S4	S5
solution d'amidon (5 g.L ⁻¹)	0,2 mL	0,45 mL	0,7 mL	0,95 mL	1,2 mL
lugol 1 %	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
solution d'enzyme	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
eau	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL	qsp 3 mL
concentration en amidon (mmol.L ⁻¹)					

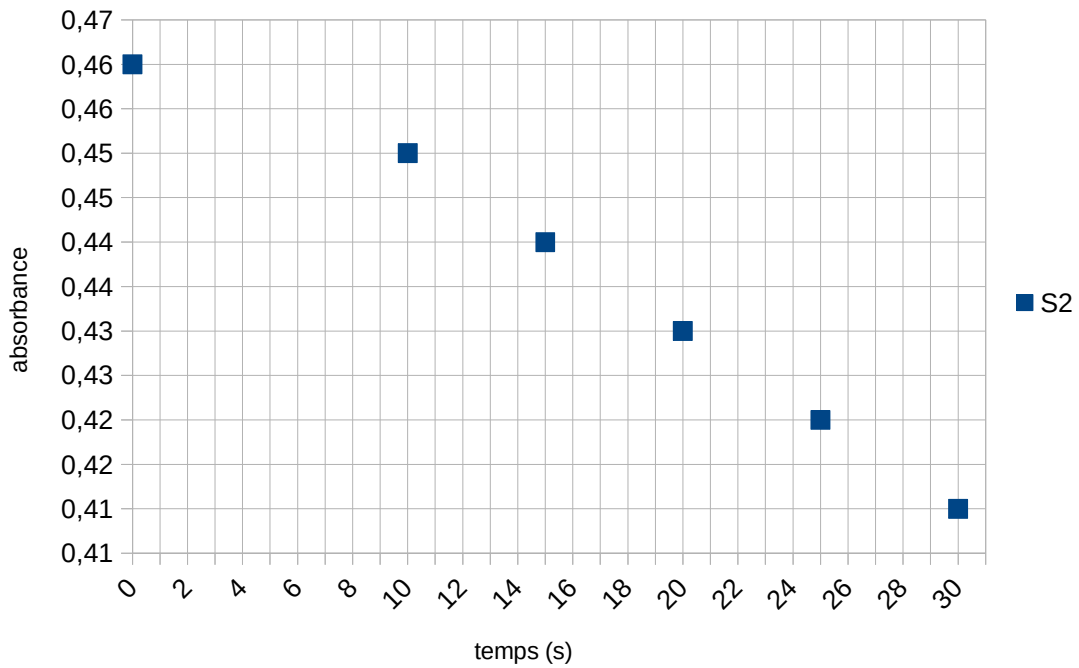
Les mesures durent 30 s pour chaque solution. On donne ci-dessous les 5 graphes correspondant à l'absorbance en fonction du temps (ainsi que les tableaux de valeurs, afin de faciliter l'analyse des résultats)

La relation $v = -\frac{1}{2\varepsilon_\lambda L} \frac{dA}{dt}$ déterminée plus haut reste vraie ici.

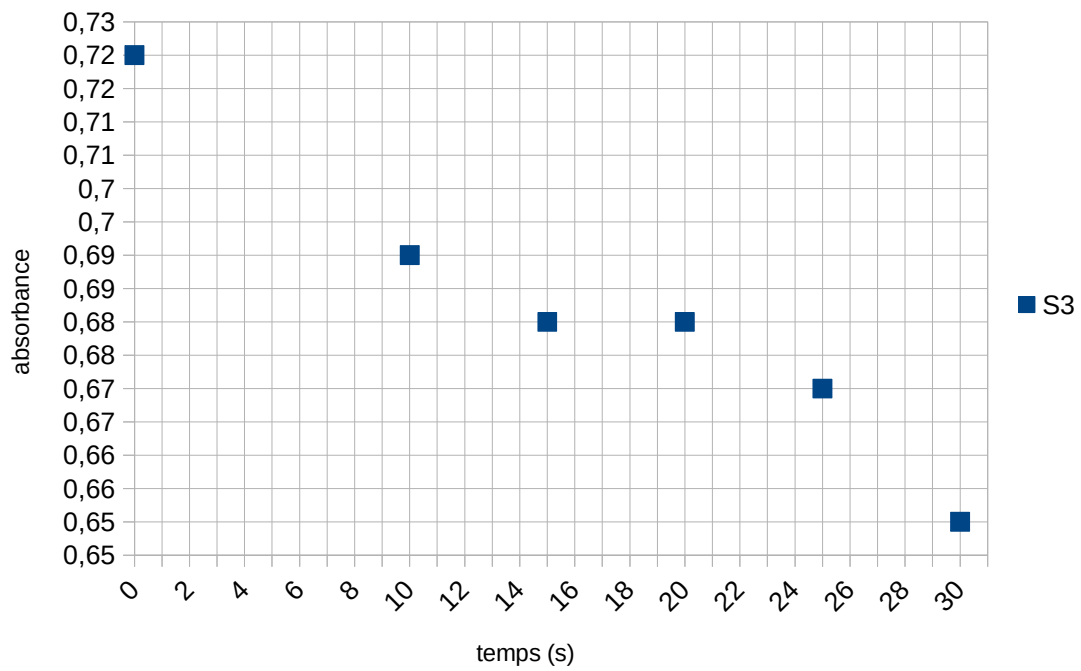
Absorbance en fonction du temps de la solution S1



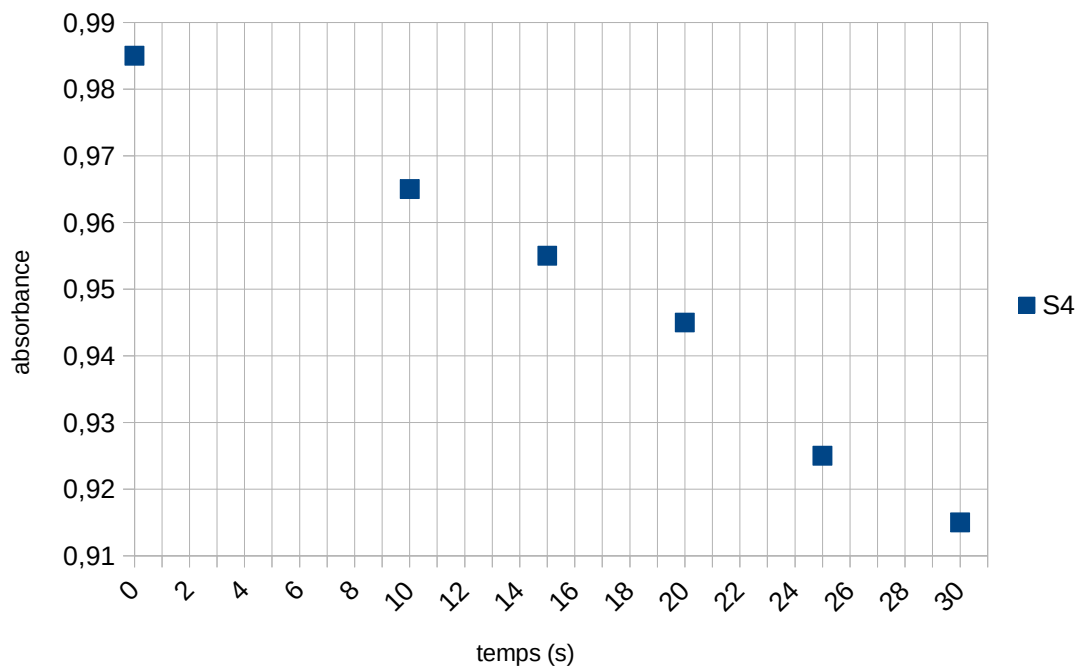
Absorbance en fonction du temps de la solution S2



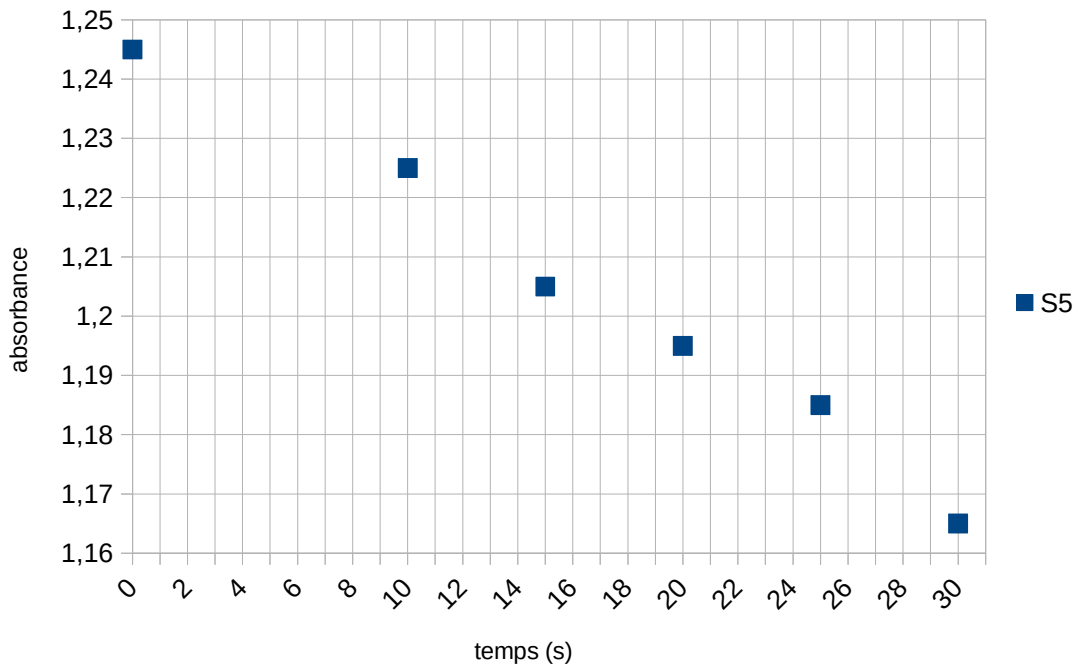
Absorbance en fonction du temps de la solution S3



Absorbance en fonction du temps de la solution S4



Absorbance en fonction du temps de la solution S5



Valeurs d'absorbances entre 0 et 30 s pour les solution S1 à S5.

temps (s)	S1	S2	S3	S4	S5
0	0,21	0,46	0,72	0,98	1,24
10	0,21	0,45	0,69	0,96	1,22
15	0,2	0,44	0,68	0,95	1,2
20	0,2	0,43	0,68	0,94	1,19
25	0,19	0,42	0,67	0,92	1,18
30	0,18	0,41	0,65	0,91	1,16

- Q10. Déterminez la vitesse initiale v_i pour chacune des cinq solutions. L'amylose semble-t-elle michaélienne ?
- 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.

III. Les hexokinases : exploitation de données cinétiques et structurales

Les hexokinase sont des enzyme catalysant la réaction **glucose + ATP** → **glucose-6-phosphate + ADP**. Il en existe deux types chez les mammifères :

- L'hexokinase généraliste, présente dans toutes les cellules (qu'on appellera simple **hexokinase**).
- La **glucokinase**, présente dans les hépatocytes seulement.

On va ici étudier quelques aspects fonctionnels et structuraux de ces deux enzymes.

➤ **Q12. Justifier le nom *hexokinase*.**

1. Analyse structurale

On étudie ici l'hexokinase de la plante *Arabidopsis thaliana*, dont la structure est proche de celle des mammifères. Les fichiers de données structurales pour toutes les protéines qui ont été étudiées sont disponibles sur le site <https://www.rcsb.org/>. Vous y téléchargerez, en format .pdb, les fichiers suivants :

- 4qs7.pdb (par moteur de recherche ou sur <https://files.rcsb.org/download/4QS7.pdb>) : hexokinase fixée à l'un de ses substrats (le glucose).
- 4qs8.pdb (par moteur de recherche ou sur <https://files.rcsb.org/download/4QS8.pdb>) : hexokinase libre.

On va analyser la structure de cette enzyme. Vous pouvez utiliser à votre convenance, l'un des logiciels suivants :

- **Rastop** : téléchargement libre sur <http://acces.ens-lyon.fr/acces/logiciels/applications/rastop>. Ce logiciel est disponible au TP du concours. Logiciel fonctionnel uniquement sur Windows ou Linux. Fiche technique téléchargeable ici : http://lycee.nicolas-cohen.org/fichiers/ft/ft_rastop.pdf (merci à Patrice Nadam, académie de Créteil)
- **Libmol** : logiciel en ligne, visualisable par n'importe quel navigateur. Avantage : très simple d'utilisation, relativement intuitif, possibilité de le télécharger et de le faire fonctionner en local. Inconvénient : non disponible au concours. Plaquette avec éléments techniques ici : https://libmol.org/docs/libmol_plaquette.pdf
- **Pymol** : téléchargement libre sur <https://pymol.org/2/>. Ce logiciel est disponible au TP du concours, et il est fonctionnel sur Windows, Mac et Linux. Il est cependant plus difficile à utiliser et moins intuitif que Libmol et Rastop.

➤ **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).**

2. Caractéristiques cinétiques et inhibition

On présente dans le tableau suivant (document 1) des données correspondant à la cinétique de l'hexokinase humaine, avec ou sans inhibiteur, de la glucokinase humaine.

[glucose] (mM)	v_i glucokinase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	v_i hexokinase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	v_i hexokinase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) + 10 M de glu-6- P
0,5	0,23	0,7	0,52
1,5	0,63	0,88	0,66
4,5	1,5	0,96	0,72
13,5	2,9	0,99	0,74
40,5	4,1	0,99	0,75

Document 1: Données cinétiques de la glucokinase, et de l'hexokinase en présence ou non de son **inhibiteur**, le glucose-6- P (glu-6- P).

Pour les deux questions suivantes, on pourra utiliser le même graphique.

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

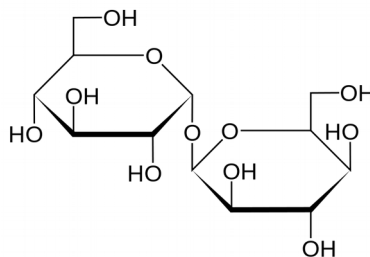
*En réalité, la glucokinase est allostérique mais nous disposons de trop peu de données (seulement 5 mesures) pour le montrer ici. Cela n'empêche pas de donner un $K_{0,5}$ pour la glucokinase, que l'on appellera K_M par abus de langage.

- **Q15. Discutez la nature de l'inhibition (compétitive ou non) par le glu-6-@.**
- **Q16. Sachant la formule du glu-6-@, pouvait-on s'attendre à une telle inhibition ?**

[glucose] (mM)	v_i hexokinase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	[glucose] (mM)	v_i hexokinase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) + trehalose	[glucose] (mM)	v_i hexokinase ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) + ADP
0,92	83	1	50	0,92	60
0,49	71	0,5	35	0,56	45
0,26	55	0,24	19	0,24	28
0,1	33	0,089	8	0,09	13
0,05	20	0,053	5		

Document 2: Données cinétiques de l'hexokinase de levure en présence ou non de deux inhibiteurs, le tréhalose (voir document 3) et l'ADP.

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

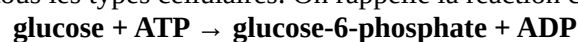


Document 3: Formule du tréhalose en représentation de Haworth.

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

3. La place des hexokinase dans la physiologie des mammifères

On rappelle que chez les mammifères, la glucokinase est strictement hépatique, alors que l'hexokinase généraliste est présente dans tous les types cellulaires. On rappelle la réaction catalysée :



Cette réaction a (au moins deux intérêts pour la cellule) :

- Elle est **la première réaction de la glycolyse**, et permet donc à la cellule de dégrader le glucose pour en retirer de l'énergie (voir ch. B12).
- Elle permet de convertir le glucose excédentaire de la circulation en glucose-6- P , lui-même converti en glucose-1- P , puis en UDP-glucose, qui est le précurseur du polymère de réserve qu'est le **glycogène**. Cette réaction a lieu en particulier dans le foie, et permet donc la régulation de la glycémie.
- **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).

NB : pour répondre à cette question :

- On pourra noter que la glycémie normale est de 1 g.L^{-1} chez l'humain, valeur qui pourrait opportunément être comparée au K_M de chacune des deux enzymes (attention aux unités !)
- On notera que le foie est très riche en transporteur passif à glucose.
- On distinguera le cas où la concentration en glucose est supérieure à cette valeur normale, et le cas où elle est inférieure.
- Il peut être opportun de tracer le graphe de v_i en fonction de $[\text{glu}]$ pour chacune des deux enzymes, soit dans un tableur à partir des valeurs du tableau du document 1, soit dans geogebra à partir de la formule théorique donnant v_i en fonction de $[\text{glu}]$, de K_M et de v_{\max} .
- **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 ?**