

## CHAPITRE

### 4

# TD7 : MODÈLES PRIMAIRES DE CINÉTIQUE DES ENZYMES À DEUX SUBSTRATS - DEUX PRODUITS

**CONSIGNES** : Vous devez traiter puis analyser les résultats obtenus. Pour cela, méthode à suivre est toujours la même :

- Écrire la réaction
- A. Mécanisme
  - Faire l'hypothèse que l'enzyme est Mickaëlienne et calculer les valeurs en double inverse
  - Tracer les régressions linéaires en double inverse sur deux graphiques primaires ( $v_0 = f([A])$  et  $v_0 = f([B])$ ) en indiquant : l'échelle, le nom des axes, les unités, un titre qui a du sens, les équations de droites, le  $r^2$ .
  - Analysez vos graphiques primaires
    - Mécanisme 1 : l'enzyme est-elle bien Mickaëlienne ?
    - Mécanisme 2 : quel est le mécanisme réactionnel ? (ordre des substrats et produits)
  - Faites un figure du mécanisme et donnez l'équation
- B. Constantes cinétiques
  - Démontrez l'équation d'un graphique secondaire
  - tracez les graphiques secondaire en indiquant : l'échelle, le nom des axes, les unités, un titre qui a du sens, l'équation de la droite, le  $r^2$ .
  - Calculez la (les) constante(s) cinétiques :  $k_{cat}$  et/ou  $V_{max}$ , les  $K_M$  : : par lecture graphique et par calcul à partir de l'équation de droite.
- Conclure

## Exercice 1 : Équations de vitesse des réactions catalysées par des enzymes Mickaëliennes

Démontrez l'équation de vitesse pour une réaction à deux substrats deux produits qui suit un mécanisme bi-bi ordonné

## Exercice 2 : Étude de la peroxydase de Raifort

Les peroxydases sont des enzymes impliquées dans l'élimination de certaines formes toxiques de l'oxygène. Leurs fonctions anti-oxydantes sont essentielles pour limiter le vieillissement cellulaire. La peroxydase de raifort est une enzyme également largement utilisée en biotechnologies pour le marquage des western-blot car elle est capable de transformer un substrat transparent : le gaïacol en un produit coloré : le gaïacol oxydé. Cette réaction nécessite en parallèle la réduction d'une molécule d'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène) en eau (x2). Le tableau 2 donne les résultats de l'étude cinétique de cet enzyme.

	(Gaiacol) mM				
( $H_2O_2$ ) mM	2,5	3	5	10	20
1	32,8	38,5	58,6	97	143
0,22	29,4	33,8	48,5	72	95
0,15	27,7	31,6	44	62,5	79
0,07	22,8	25,4	33	42,3	49,3

TABLE 4.1 – Vitesse initiale de réaction (en mole de S /mole enzyme/seconde) à différentes concentrations en  $H_2O_2$  et en Gaïacol

### Question 1

Déterminez le mécanisme d'action et les constantes cinétiques associées

### Exercice 3 : Etude de l'adénosine 5'-Phosphosulfate kinase - facultatif

L'adénosine 5'-Phosphosulfate kinase est une enzyme qui participe à l'incorporation de sulfate dans les molécules organiques. La réaction est étudiée dans le sens de la phosphorylation de l'ADP à partir de l'adénosine 3'-phosphate-5' phosphosulfate (PAPS).

	(PAPS) $\mu M$			
(ADP) mM	3,2	5,12	10,24	192
0,33	0,017	0,025	0,042	0,117
0,5	0,021	0,03	0,049	0,119
1	0,027	0,038	0,059	0,122
5	0,034	0,047	0,07	0,124

TABLE 4.2 – Vitesses initiales de réaction (en mM de substrat consommé par min) en fonction des concentrations en PAPS et en ADP.

#### Question 1

Donnez le mécanisme réactionnel ainsi que les constantes cinétiques associées.