

**TD1 D'ENZYMOLOGIE APPROFONDIE
GENERALITES, CLASSIFICATION, STRUCTURE ET
DOSAGE DES ENZYMES,
3^{ème} ANNEE LICENCE BIOCHIMIE
ANNEE 2020-2021**

Exercice N° 1

Pour mesurer l'activité d'une enzyme, on mesure l'absorbance à 340 nm en fonction du temps, dans une cuve de 1 cm de trajet optique, de 1 ml de solution contenant l'enzyme et le substrat dont le coefficient d'extinction molaire est de $6000 \text{ L.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 340 nm. L'enzyme provient de 100 μl de sérum auquel on additionne 900 μl d'une solution de substrat.

1. Définir l'activité catalytique d'une enzyme en UI et en katal ?
2. Sachant que la variation d'absorbance est de 360 /min, calculer l'activité de cette enzyme en katal ?

Exercice N° 2

Le dosage de la LDH sérique permet de mettre en évidence des lésions du muscle cardiaque et du foie. Elle catalyse la réaction suivante :



On introduit dans la cuve en quartz d'un spectrophotomètre :

- 2.8 ml d'une solution de NADH à pH 7.5 et à $T^\circ = 25 \text{ }^\circ\text{C}$
- 0.1 ml de sérum
- 0.1 ml de Pyruvate

On mélange rapidement et on place la cuve dans le compartiment thermostaté du spectrophotomètre. Les résultats de mesure de l'absorbance en fonction du temps sont :

Temps (s)	0	30	60	90	120
Absorbance	0.56	0.54	0.52	0.50	0.48

- 1) A quel groupe d'enzyme appartient la LDH ? Ecrire le code de l'enzyme ?
- 2) justifier
 - l'utilisation d'une cuve en quartz
 - l'utilisation d'un compartiment thermostaté à 25 ° C.
 - l'emploi d'une solution tamponnée.
- 3) Calculer l'activité enzymatique de la LDH du sérum sachant que son expression est en UI par litre et que le coefficient d'absorbance molaire (ϵ) est de $6.3 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Exercice N° 3

La phosphofructokinase (PFK) est une enzyme composée de 4 sous-unités liées entre elles par des liaisons de faible énergie.

Il existe 3 classes de sous-unités de poids moléculaires différents :

- Sous-unité L (PM 87500)
- Sous-unité M (PM 85000)
- Sous-unité C (PM 80000)
- L'enzyme a été purifiée à partir de différents tissus de rat puis soumise à électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les quantités de chaque sous-unité trouvées dans les différents tissus ont été évaluées par densitométrie et par précipitation avec des anticorps spécifiques de chacune des 3 ss-u. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	% de ss-u L	% de ss-u M	% de ss-u C
1 Muqueuse intestinale	50	-	50
2 Cœur	50	-	50
3 Muscle squelettique	75	25	-
4 Diaphragme	-	100	-
5 Foie	-	100	-

- 1) Dessiner les profils électrophorétiques obtenus en gels de polyacrylamide- SDS des PFK des différents tissus (placer comme échantillon n°1, le mélange standard L+M+C plus les 5 échantillons correspondants aux tissus sur un même gel en plaque)/
- 2) Donner la formule des PFK de chaque tissu en fonctions des unités L, M et C.
- 3) Quel est le nom de ces formes moléculaires différentes ayant une même activité.

Correction du TD

Exercice N° 1

1-

- Définition de l'Unité Internationale (UI) : C'est la quantité d'enzyme qui transforme **une μmole de substrat par minute**, dans les conditions opératoires définies (pH, T°,...).
- Définition du Katal : C'est la quantité d'enzyme qui transforme **une mole de substrat par seconde**, dans les conditions opératoires définies (pH, T°,...).

2- Calcul de l'activité de l'enzyme en Katal pour cela on applique la formule suivante :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\Delta \text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot V_t}{\epsilon \cdot L \cdot V_e}$$

V_t : volume total = 1 ml

V_e : volume de l'échantillon (prise d'essai) = 100 μl

ϵ = 6000 L.mol⁻¹.cm⁻¹

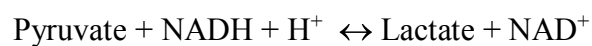
Δ Abs = 360/min

L : Trajet optique = 1 cm

$$\text{Activité enzymatique} = 0,01 \text{ Katal/L}$$

Exercice N° 2

1-La réaction catalysée par la LDH est la suivante :



La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'acide pyruvique en acide lactique et vice versa.

Cette enzyme appartient au premier groupe Oxydoréductase agissant sur un groupement CH – OH du donneur d'hydrogène, avec NAD comme accepteur d'hydrogène.

Le code de la LDH (EC 1.1.1.27)

Classement de la LDH : (Aidez vous de la planche)

- Elle appartient à la classe des oxydoréductases (classe 1)
- Sous-classe des oxydoréductases utilisant –CH-OH- comme donneur d'électrons (sous- classe1)
- Sous-sous classe des oxydoréductases utilisant NAD⁺ ou NADP⁺ comme accepteur d'électrons (sous-sous classe 1)
- Numéro de série (ordre) attribué 27

2-Justifier :

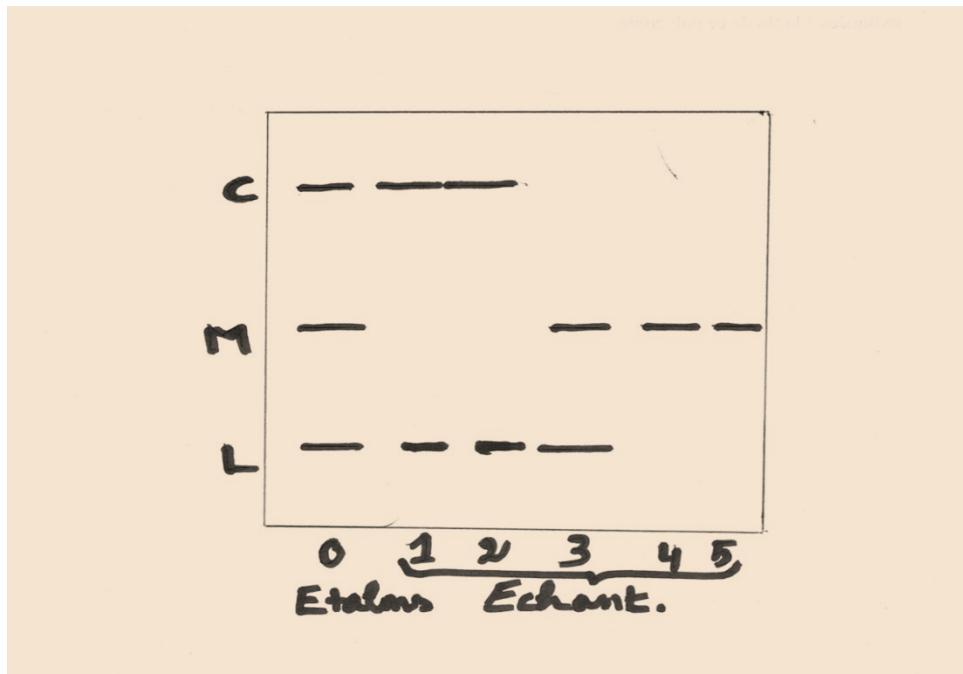
- On justifie l'utilisation d'une cuve en quartz par la fait que le dosage est réalisé dans le domaine de l'UV (340 nm) qui est la valeur maximale de l'absorbance du NADH ;
- L'activité de l'enzyme est fonction de la température, une faible variation de la température entraine une incertitude du résultat donc l'utilisation d'un compartiment thermostaté s'impose (25°C est la température optimale de l'enzyme).
- L'activité enzymatique est également fonction du pH. Le milieu est tamponné pour prévenir toute variation de pH. (pH 7,5 est le pH optimum de l'enzyme).

3-Calcul de l'activité enzymatique de la LDH en UI/Litre ; on applique la même formule que l'exercice 1.

Activité enzymatique (LDH) = 190,48 UI/L

Exercice N° 3

1) Profils électrophorétiques des PFK des différents tissus :



2) Formule des PFK en fonction des sous-unités L, M, C :

Echantillon 1 : Muqueuse intestinale : L₂ C₂

Echantillon 2 : Cœur : L₂ C₂

Echantillon 3 : Muscle squelettique : L₃ M

Echantillon 4 : Diaphragme : M₄

Echantillon 5 : Foie : M₄

3) On appelle les différentes formes moléculaires ayant une même activité catalytique : isoenzymes.

NB : vous pouvez aussi télécharger Enzyme classification and nomenclature publié par Sinead boyce, Keith F. Tipton 2001 pour plus d'information concernant la classification des enzymes.

CLASSIFICATION DES ENZYMES

1. — Oxydoréductases

Cette classe comprend les anciennes déshydrogénases, oxydases, peroxydases, hydroxylases, oxygénases, etc.

1.1. Agissant sur un groupement CH-OH (du donateur d'hydrogène):

- 1.1.1. Avec le NAD^+ ou le NADP^+ comme accepteur d'hydrogène
Ex. L-malate : NAD-oxydoréductase (1.1.1.37), voir fig. 4-38.
L-lactate : NAD-oxydoréductase (1.1.1.27), voir fig. 4-30.
- 1.1.2. Avec un cytochrome comme accepteur
Ex. L-lactate : ferricytochrome c-oxydoréductase (1.1.2.3).
- 1.1.3. Avec O_2 comme accepteur d'hydrogène
Ex. glucose oxydase ou β -D-glucose : oxygène-oxydoréductase (1.1.3.4.).

1.2. Agissant sur un groupement C=O (aldéhyde ou cétone):

- 1.2.1. Avec le NAD^+ ou le NADP^+ comme accepteur
Ex. D-glycéraldéhyde-3-phosphate : NAD-oxydoréductase (1.2.1.12), voir fig. 4-27.
- 1.2.3. Avec O_2 comme accepteur
Ex. xanthine : oxygène oxydoréductase (1.2.3.2), voir fig. 7-32.
- 1.2.4. Avec l'acide lipoïque comme accepteur.

1.3. Agissant sur un groupement CH-CH :

- 1.3.1. Avec le NAD^+ ou le NADP^+ comme accepteur
Ex. 4,5 dihydrouracile : NAD oxydoréductase (1.3.1.1.1).
- 1.3.2. Avec un cytochrome comme accepteur.
- 1.3.3. Avec O_2 comme accepteur
Ex. 4,5-dihydro-orotate : oxygène oxydoréductase (1.3.1.1.1), voir fig. 6-22.

1.4. Agissant sur un groupement CH-NH- :

- 1.4.1. Avec le NAD^+ ou le NADP^+ comme accepteur
Ex. L-glutamate : NAD oxydoréductase (1.4.1.2), voir fig. 7-3.

etc.

2. — Transférases

2.1. Transférant un groupement monocarboné (C_1):

- 2.1.1. Méthyl transférases
Ex. S-adenosyl-méthionine : L-homocystéine S-méthyl transférase (2.1.1.10).
- 2.1.2. Hydroxyméthyl transférases et formyl transférases
Ex. L-sérine : tétrahydrofolate 5, 10-hydroxyméthyl transférase (2.1.2.1), voir fig. 7-9.
- 2.1.3. Carboxyl transférases et carbamoyl transférases
Ex. carbamylphosphate : L-aspartate carbamyl transférase (2.1.3.2), voir fig. 6-22.

2.3. Acyl transférases.

2.4. Glycosyl transférases :

- 2.4.1. Hexosyl transférases
Ex. UDPG-glucose : D-fructose glucosyl transférase (2.4.1.13).

- 2.4.2. Pentosyl transférases
Ex. Uridine : orthophosphate ribosyltransférase (2.4.2.3).
- 2.5. Alkyl transférases.
- 2.6. Transférant des groupements azotés :
- 2.6.1. Amino transférases
Ex. L-aspartate : cétoglutarate amino transférase (2.6.1.1), voir p. 417.
- 2.7. Phosphoryl transférases :
- 2.7.1. Avec un groupement alcool comme accepteur
Ex. ATP : D-hexose-6-phosphotransférase (2.7.1.1), voir fig. 4-20.
- 2.7.2. Avec un groupement carboxylique comme accepteur
Ex. ATP : 3-phosphoglycérate 1-phospho transférase (2.7.2.3), voir fig. 4-28.
- 2.7.3. Avec un groupement azoté comme accepteur
Ex. ATP : créatine phosphotransférase (2.7.3.2) voir fig. 7-13.
- etc.

3. — Hydrolases

- 3.1. Scindant les liaisons esters :
- 3.1.1. Carboxylester-hydrolases
Ex. Lipase ou glycérol-ester hydrolase (3.1.1.3), voir p. 245.
- 3.1.3. Phosphomonoestérases
Ex. phosphatase alcaline (3.1.3.1), voir fig. 6-13.
- 3.1.4. Phosphodiesterases
Ex. ribonucléases, désoxyribonucléases, voir fig. 6-10 à 6-12.
désoxyribonucléate 3' nucléotido hydrolase (3.1.4.6).
- 3.2. Scindant les liaisons osidiques
- 3.2.1. Glucosidases
Ex. β -glucosidase ou β -D-glucoside glucohydrolase (3.2.1.21).
- 3.4. Scindant les liaisons peptidiques
- 3.4.1. α -aminopeptido-aminoacide hydrolases
Ex. aminopeptidase ou aminoacyl-peptide hydrolase (3.4.1.2), voir p. 22.
- 3.4.2. α -carboxypeptido-aminoacide hydrolases
Ex. carboxypeptidase A ou peptidyl-L aminoacide hydrolase (4.3.2.1), voir p. 23.
- 3.4.4. Peptido-peptide hydrolases (endopeptidases)
Ex. trypsine (3.4.4.4), voir fig. 2-25.

4. — Lyases

Catalysant l'enlèvement d'un groupement autrement que par hydrolyse (soit souvent création d'une double liaison) ou au contraire l'addition d'un groupement.

4.1. C-C lyases

4.1.1. Carboxylyases (Carboxylases ou Décarboxylases)
Ex. aspartate décarboxylase ou L-aspartate 4 carboxylyase (4.1.1.12), voir p. 414-415.

4.1.2. Aldéhyde-lyases
Ex. fructose-bisphosphate aldolase ou fructose 1-6 bisphosphate : D-glyceraldéhyde-3-phosphate lyase (4.1.2.13), voir fig. 4-26.

4.2. C-O lyases

4.3. C-N lyases

4.3.1. Ammoniac lyases

Ex. L-aspartate-ammonium lyase (4.3.1.1), voir fig. 7-5.

etc.

5. — Isomérases

5.1. Racemases et épimérases

5.1.1. Agissant sur les aminoacides
Ex. alanine racémase (5.1.1.1), voir p. 414.

5.1.3. Agissant sur les oses
Ex. D-ribulose-5-phosphate-3 épimérase (5.1.3.1), voir fig. 4-40.

5.2. Cis-trans-isomérases

Ex. 4 maleyl-acéto acétate cis-trans isomérase (5.2.1.2), voir fig. 7-24.

5.3. Oxydo-réductases intramoléculeaires

5.3.1. Catalysant l'interconversion aldose-cétose
Ex. D-glyceraldéhyde 3 phosphate cétose-isomérase ou triose-phosphate isomérase (5.3.1.1), voir fig. 4-26.

5.4. Transférases intramoléculeaires

Ex. L-méthylmalonyl-coA-coA-carbonyl mutase (5.4.99.2), voir fig. 5-13.

etc.

6. — Ligases ou synthétases

Enzymes permettant l'union de 2 molécules, couplée avec la rupture d'une liaison à haut potentiel énergétique (par exemple rupture d'une liaison pyrophosphate de l'ATP ou d'un autre nucléoside-triphosphate).