

II – Les Enzymes

1 - Introduction – Définitions

2 - Les cofacteurs enzymatiques

A - biotine (ou vitamine B8)

B - Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺)

3 - La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

B - catalyse enzymatique

C - notion de site actif

D - introduction à la cinétique enzymatique

E – mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule



1 – Introduction – Définitions

Chez tous les organismes vivants, les réactions chimiques sont catalysées par des molécules de **nature protéique** que l'on appelle **enzymes**.

Un ou une enzyme est un **catalyseur** biologique.

Une enzyme **accélère** la transformation d'une ou de plusieurs molécules en une ou plusieurs autres molécules.

Les molécules transformées s'appellent **substrats** et les molécules obtenues sont appelées **produits**.

2 – Les cofacteurs enzymatiques

Le cofacteur d'une enzyme est une molécule qui **apporte un groupement chimique important pour la catalyse enzymatique**, groupement que ne possède pas forcément l'enzyme seule.

Il peut s'agir d'un **ion** ou d'un **coenzyme**.

Il y a 2 familles de coenzymes :

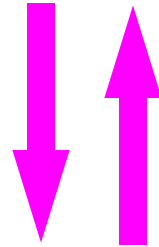
- **transitoirement** liés à l'enzyme → **co-substrats**
- **liés de façon covalente** à l'enzyme → **groupes prosthétiques**

2 – Les cofacteurs enzymatiques

apoenzyme
(inactif)

+

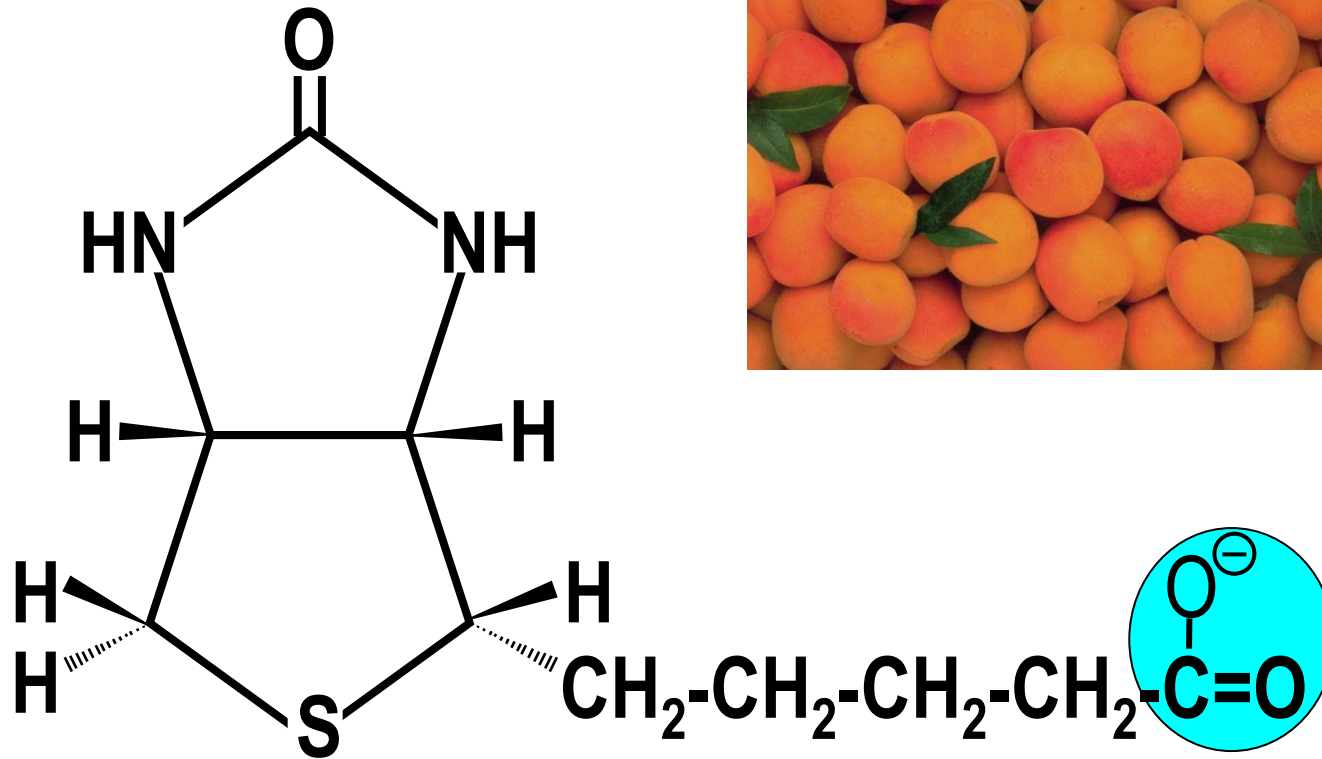
cofacteur



holoenzyme
(actif)

2 – Les cofacteurs enzymatiques

A - biotine (ou vitamine B8)



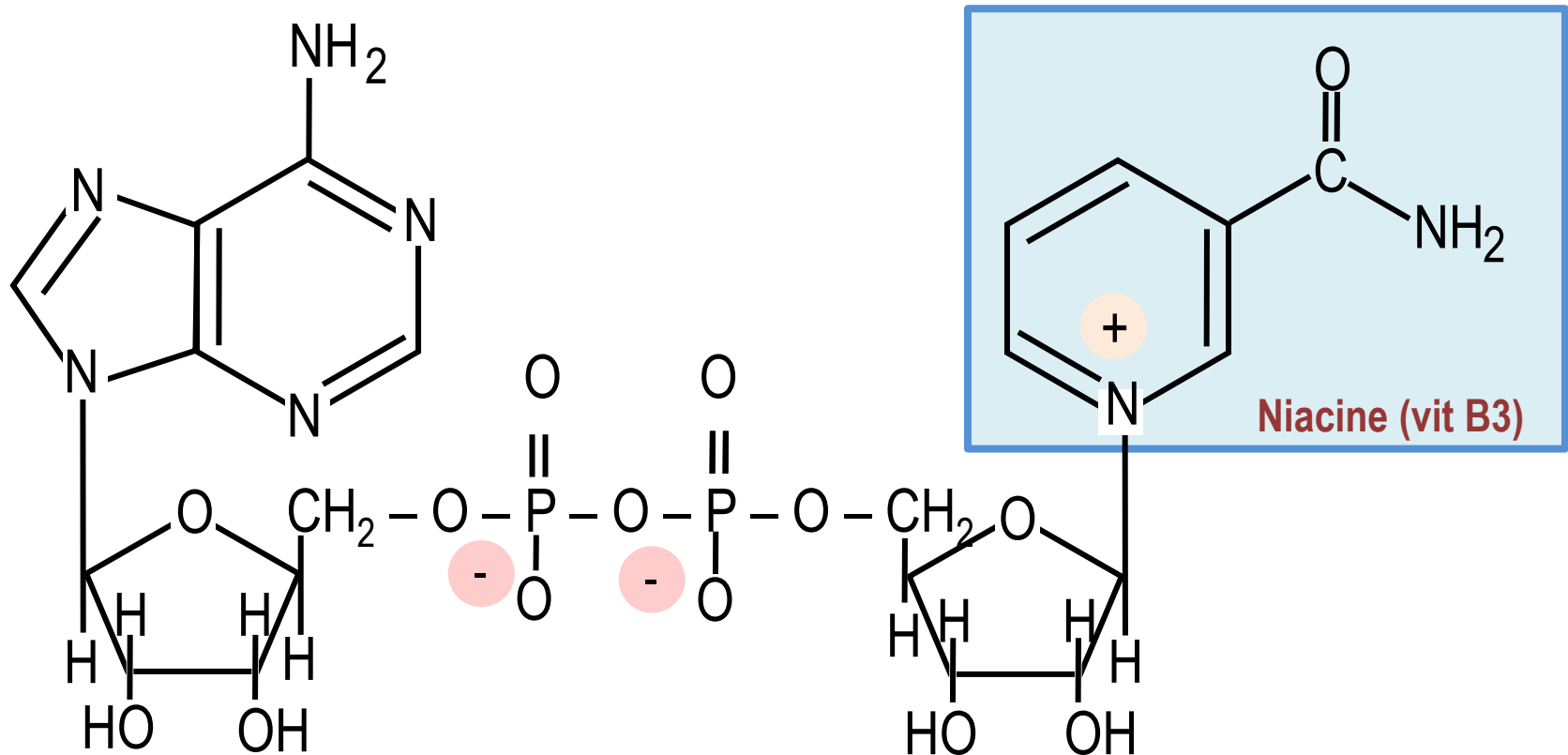
Liaison avec fonction
amine d'une lysine

Retrouvée dans les réactions de carboxylation (ajout d'une fonction acide carboxylique)



2 – Les cofacteurs enzymatiques

B - Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺)



Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺)



3 – La réaction enzymatique

La transformation d'une molécule en une autre, catalysée par un ou une enzyme, s'écrit ainsi :



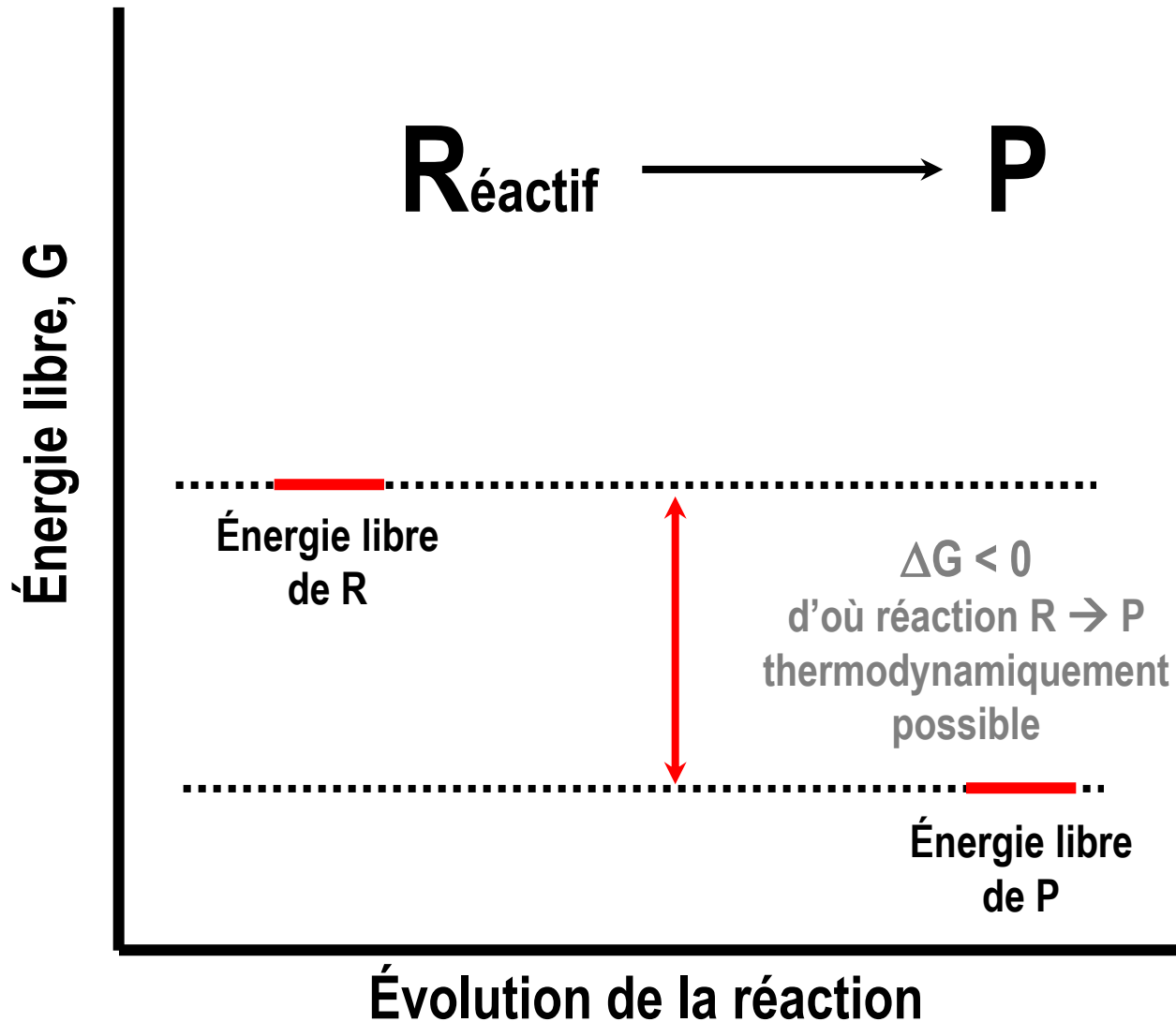
S : substrat

P : produit

E : enzyme

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée



3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

Attention, un $\Delta G < 0$ ne signifie pas que la réaction a lieu.

Cela signifie qu'elle est possible thermodynamiquement.

L'oxydation complète du saccharose par l' O_2 est très exergonique (ΔG très négatif) :



pourtant le sucre qui se trouve dans votre placard en contact avec l'oxygène de l'air ne s'enflamme pas en libérant de l'eau et du gaz carbonique.

La réaction est possible mais sans catalyseur elle se déroule à une vitesse imperceptible.

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

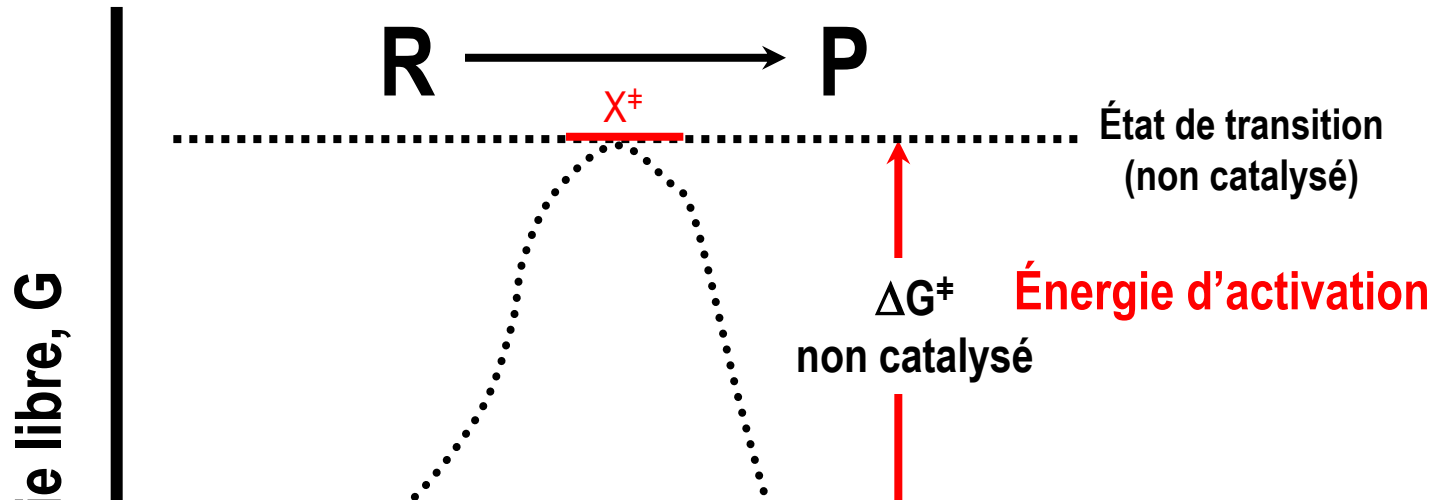
Pourquoi ?

Parce que la molécule R, pour se transformer en molécule P, doit passer une barrière d'énergie.

Cette barrière correspond à l'énergie thermique nécessaire pour que la molécule R soit en "position" correcte pour être transformée en molécule P, c'est à dire pour que R atteigne **son état de transition**.

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée



L'énergie libre de l'état de transition donne une idée de la vitesse de la réaction :

plus cette énergie d'activation est élevée, plus la vitesse de la réaction sera faible.

Évolution de la réaction



3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

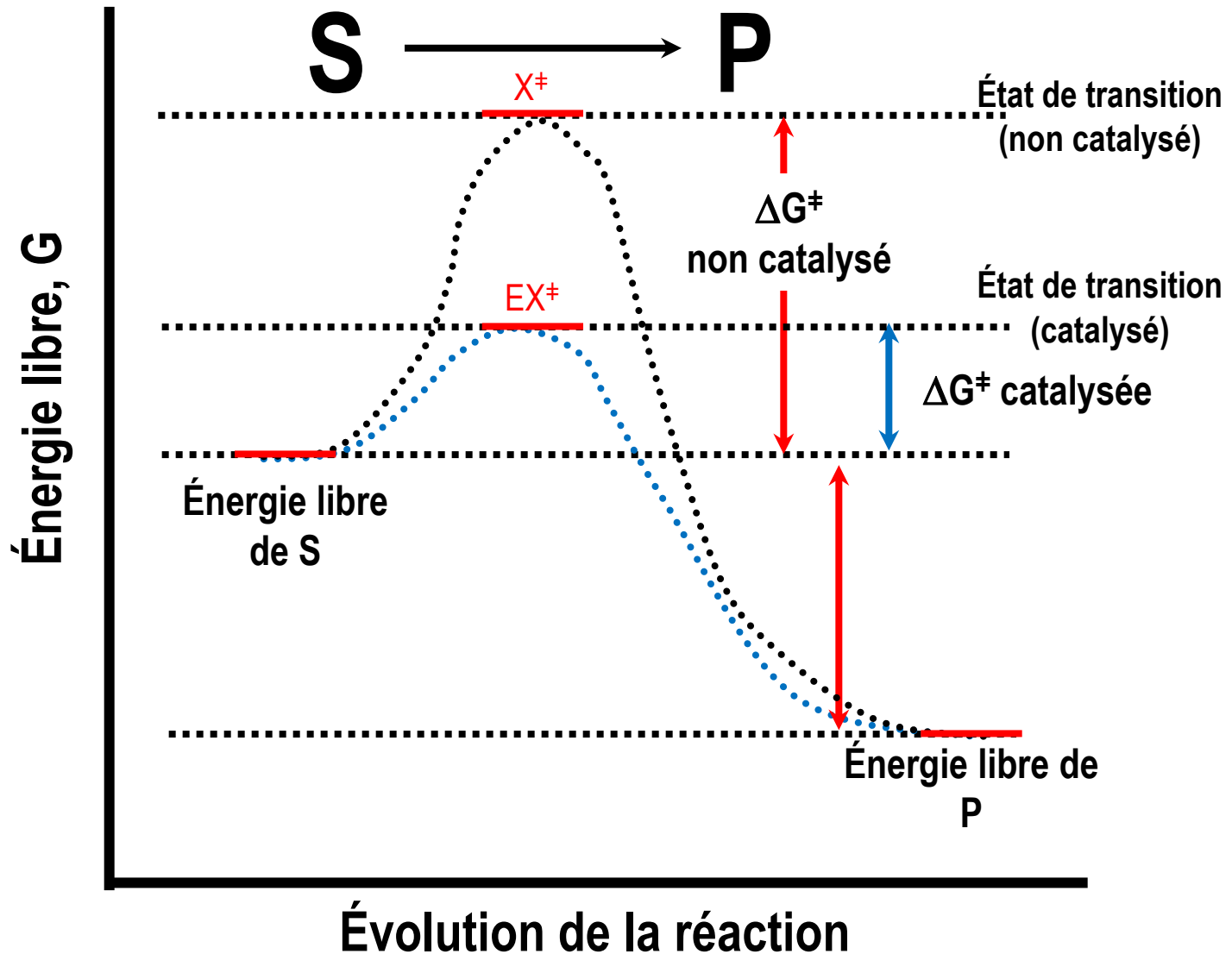
L'état de transition X^\ddagger n'est obtenu en quantité que **pour des températures très élevées.**

En conditions douces de température réaction probable que pour **un très faible nombre** de molécules (quelques réactions/sec ou moins) : **à notre échelle, on ne détecte rien!!**

L'enzyme, en fixant le substrat et en l'orientant de façon constante et optimale, abaisse l'énergie de l'état de transition.

3 – La réaction enzymatique

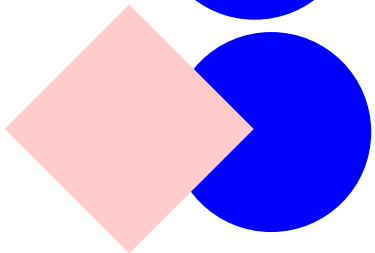
B - catalyse enzymatique



3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

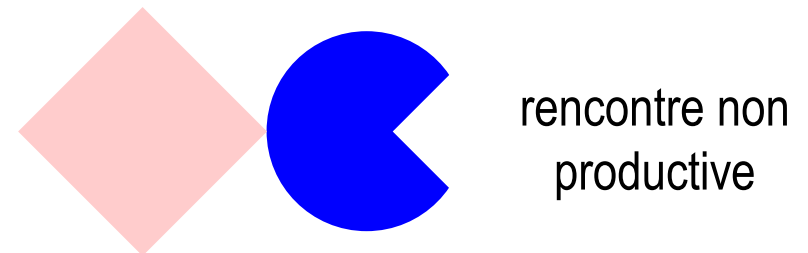
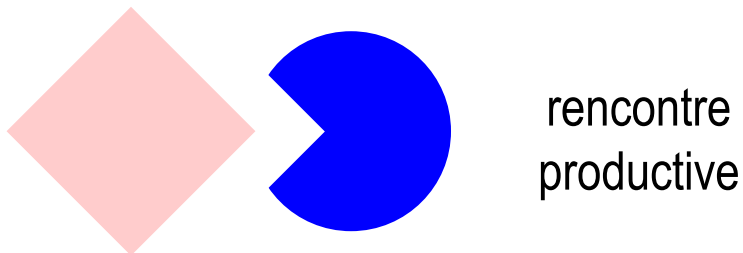
Soit :  S1 et  S2 , 2 molécules pouvant réagir ensemble

pour donner :  P , une troisième molécule.

Le passage de $S1+S2$ à P est très favorable ($\Delta G < 0$).

Pour qu'il ait lieu, S1 et S2 sont mélangés.

Pour que les 2 molécules réagissent, elles doivent se rencontrer en un point bien précis :



3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

Probabilité d'avoir une rencontre productive (donc une réaction) faible.

Comment favoriser les rencontres productives ?

→ nécessaire d'augmenter le nombre total de rencontres en augmentant la température du milieu (agitation thermique).

Avec une enzyme, la situation est différente :

la protéine **fixe toujours de la même façon** les molécules S1 et S2, de manière à ce qu'elles soient toujours orientées de façon optimale.

3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

ENZYME

Site actif

S1

S2



3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

L'énergie thermique du milieu suffit à former le complexe enzyme-substrats : formes géométriques et propriétés physico-chimiques de ces molécules sont **complémentaires**.

Une fois formé, le complexe enzyme-substrat(s) a de fortes chances de fabriquer le produit final sans qu'il ne soit apporté au milieu une énergie calorifique élevée.

L'enzyme permet d'accélérer fortement la réaction **en augmentant la probabilité de rencontre productive** de S1 et S2 en les **fixant à proximité l'un de l'autre** dans son site actif.

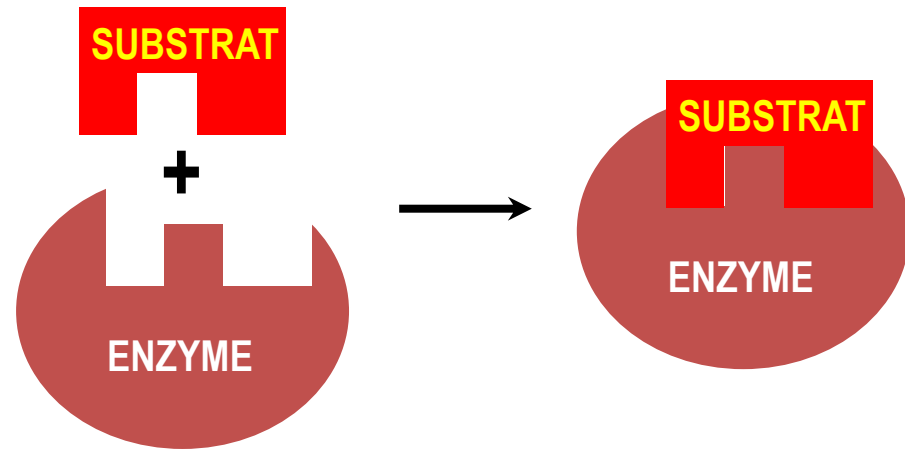
3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

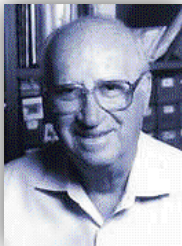
1894 MODELE DE FISHER : CLE-SERRURE



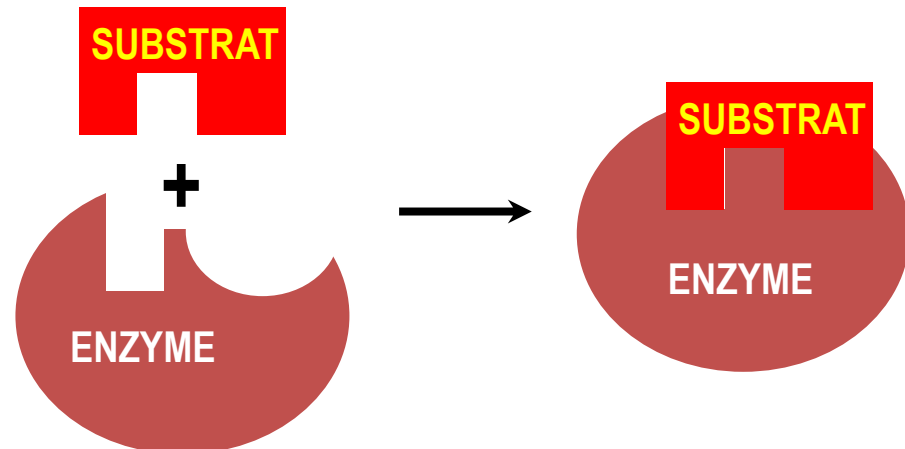
Hermann Emil Fischer



1958 MODELE DE KOSHLAND : AJUSTEMENT INDUIT



Daniel Koshland Jr.



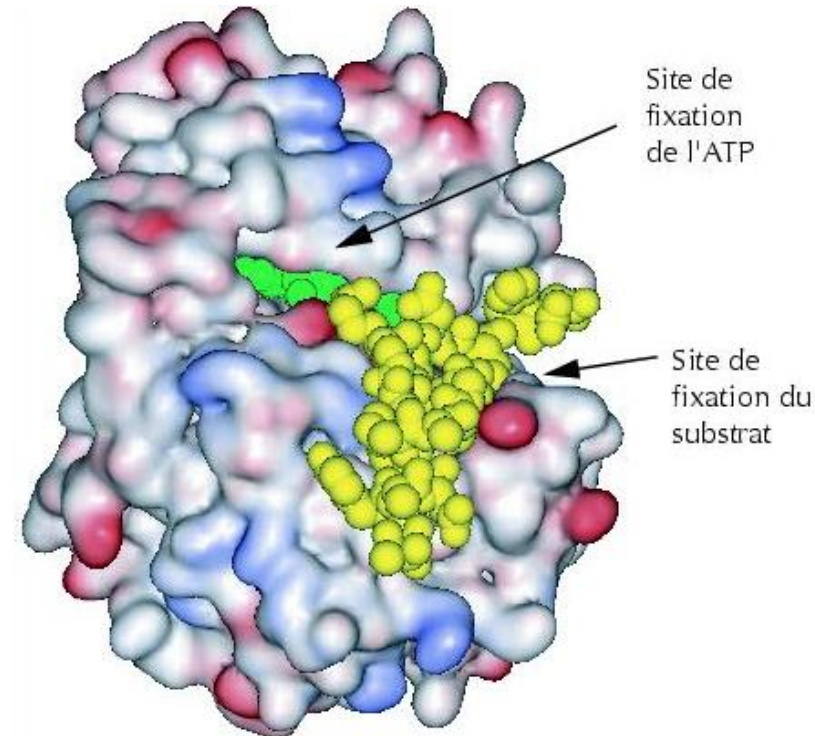
3 – La réaction enzymatique

C - notion de site actif

La structure 3D de l'enzyme fait apparaître une zone qui lie les substrats et permet leur réaction : **site actif** ou **site catalytique**.

Le site actif ou site catalytique est une poche taillée pour accepter un substrat particulier.

Le repliement de la chaîne polypeptidique a pour conséquence que le site actif est constitué d'acides aminés qui peuvent être parfois très éloignés les uns des autres dans la structure primaire.



Protéine kinase A avec ATP en vert et peptide inhibiteur en jaune.

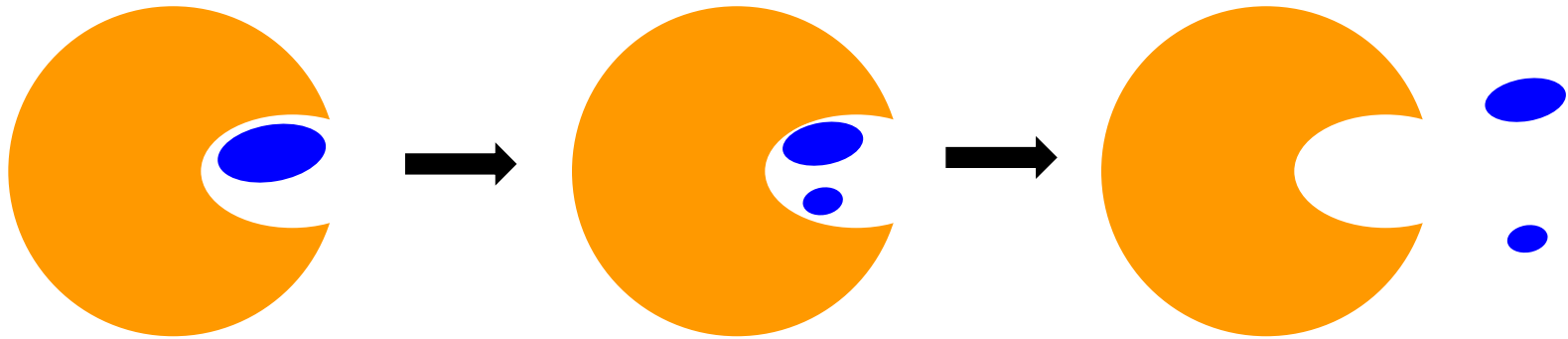
Rouge régions négatives et bleu régions positives.



3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Le substrat se fixe dans le site actif, il est ensuite modifié pour donner une ou plusieurs autres molécules appelées produits puis il y a relargage du ou des produits dans le milieu.



L'enchainement de ces évènements ne prend qu'une fraction de seconde (10^{-6} à 10^{-1} sec selon les enzymes).

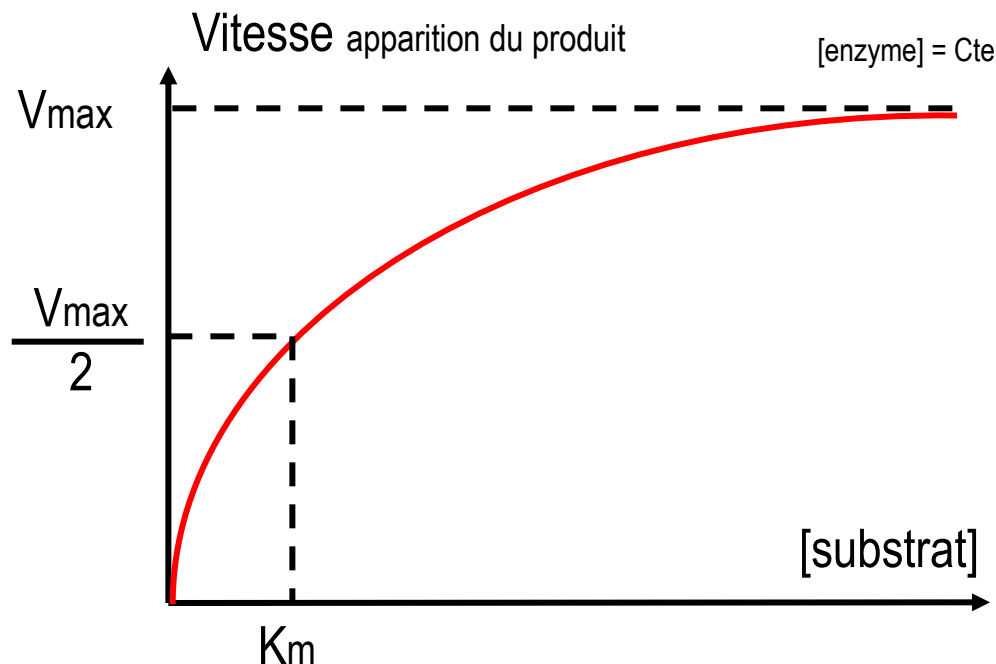
Pour une molécule d'enzyme donnée, le nombre de réactions catalysées par unité de temps est donc un nombre fini (de 10 à 10^6 /sec).

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Ce nombre maximum de réactions catalysées par unité de temps s'appelle le « **turn over number** ». Il est proportionnel à la **vitesse maximale** de l'enzyme.

La **vitesse maximale** n'est obtenue que pour des concentrations élevées en substrat.



Pour des concentrations faibles en substrat, les molécules d'enzyme ne fonctionnent pas au maximum de leur capacité.

A la $\frac{1}{2} V_{max}$, on trouve une concentration de substrat qui correspond à une constante intrinsèque de l'enzyme traduisant son **affinité** pour le substrat.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Cinétique Michaelienne

1879-1960



Maud Menten
1^{ère} canadienne à
être médecin en
1913.

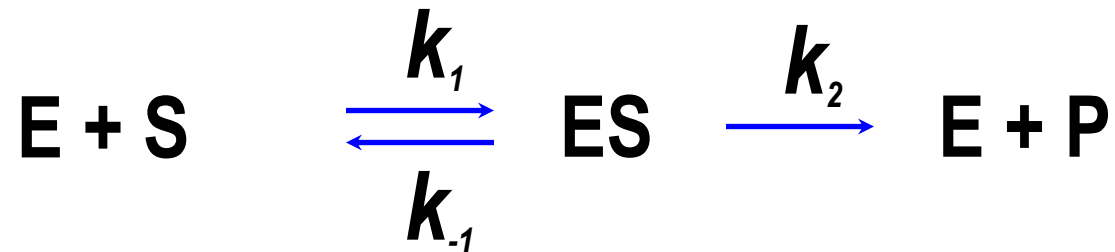


Leonor Michaelis,
Université de Berlin,
Professeur de biochimie à
Nagoya au Japon,
Professeur au «Rockefeller
Institute of Medical
Research» à New York .

1875-1949

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique



La vitesse d'apparition du produit P (vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme) dépend de k_2 et de la concentration en ES.

$$v_i = k_2 [ES]$$

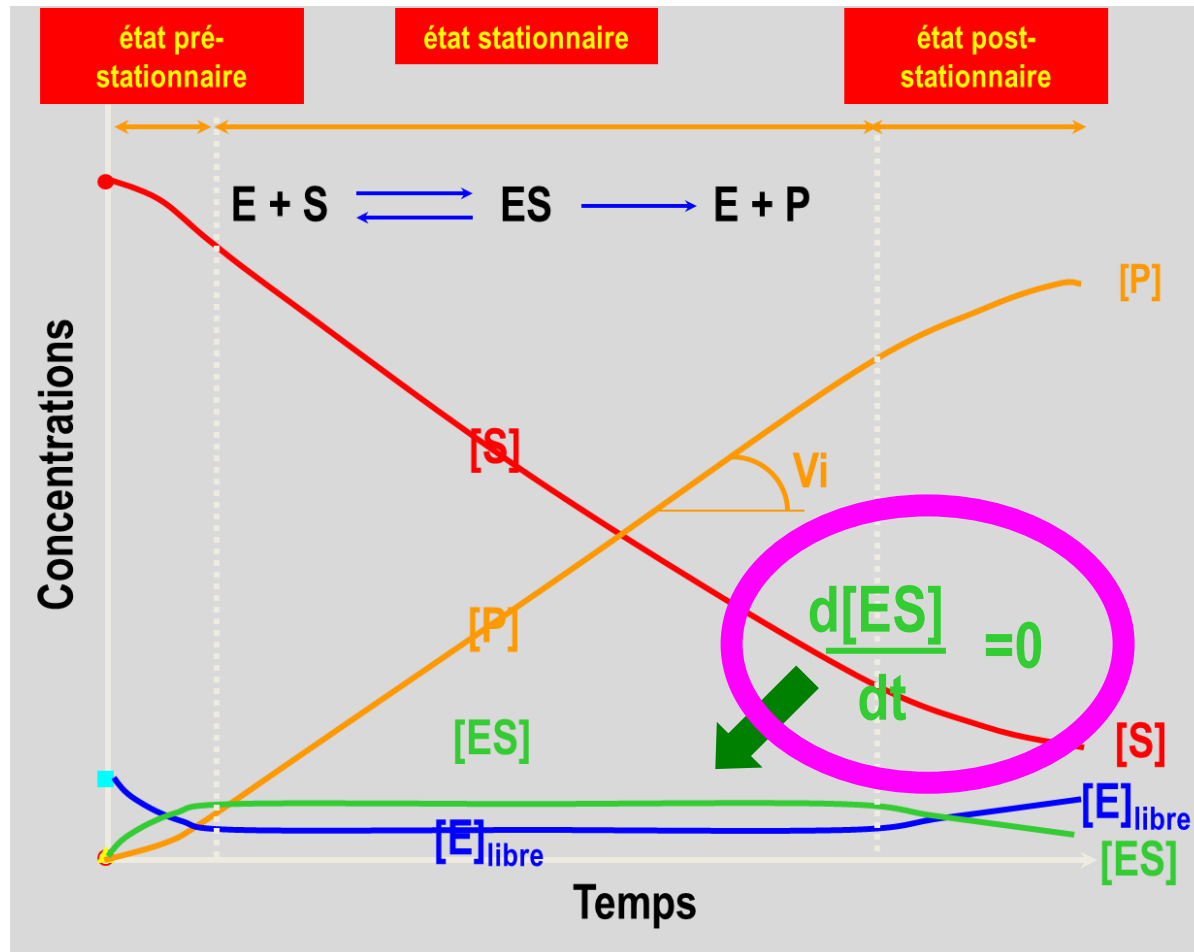
La [ES] dépend de sa vitesse de formation et de sa vitesse de disparition.

$$v_{\text{formation ES}} = k_1 [E] [S]$$

$$v_{\text{disparition ES}} = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique



3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Pendant l'état dit "stationnaire" ou en "vitesse initiale", les vitesses de formation et de disparition de ES sont égales.

$$V_{\text{formation ES}} = V_{\text{disparition ES}}$$

$$(k_{-1} + k_2) [ES] = k_1 [E] [S]$$

Si on réarrange l'expression mathématique :

$$[ES] = \frac{k_1 [E] [S]}{(k_{-1} + k_2)}$$

ou

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}}$$

On simplifie l'équation en définissant une nouvelle constante, K_M , appelée constante de Michaelis et Menten :

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Si on réarrange l'expression mathématique :

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_M}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_M}$$

Si l'on regarde le numérateur de cette équation, la $[S]$ est égale (en approximation) à celle de départ ($[S]_0$), puisque la concentration en substrat est très largement supérieure à celle en enzyme.

La concentration en enzyme libre $[E]$ est difficile à appréhender expérimentalement mais on sait qu'elle doit être égale à la concentration totale en enzyme ($[E]_T$) moins la concentration en enzyme lié ($[ES]$).

$$[E] = [E]_T - [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_M}$$

devient

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) [S]}{K_M}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Si on développe

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) [S]}{K_M}$$

cela devient

$$[ES] = \frac{[E]_T [S] - [ES] [S]}{K_M}$$

$$[ES] + \frac{[ES] [S]}{K_M} = \frac{[E]_T [S]}{K_M}$$

$$[ES] \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) = \frac{[E]_T [S]}{K_M} \quad [ES] = [E]_T \frac{\frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Or on sait que : $V_i = k_2 [ES]$

On peut donc écrire : $V_i = k_2 [E]_T \frac{\frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$

On peut simplifier :

$$v_i = k_2 [E]_T \frac{\frac{[S]}{\cancel{K_M}}}{\frac{\cancel{K_M}}{\cancel{K_M}} + \frac{[S]}{\cancel{K_M}}} = k_2 [E]_T \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

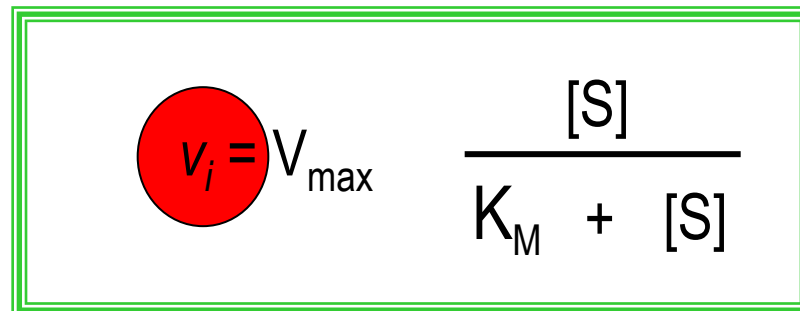
$$v_i = k_2 [E]_T \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Lorsque toutes les molécules d'enzyme sont saturées, $[ES] = [E]_T$ et la vitesse de transformation du substrat en produit est alors maximale :

$$V_{\max} = k_2 [E]_T$$

L'équation de *Michaelis-Menten* devient :

Vitesse initiale



$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$[S] = \# K_M$	$v_i = \% V_{\max}$
1	50,00
2	66,67
5	83,33
10	90,91
50	98,04
100	99,01
500	99,80
1000	99,90

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

- Peut-on attribuer à K_M une signification concrète?

Si $v_i = \frac{1}{2} V_{\max}$

~~$\frac{1}{2} V_{\max} = V_{\max}$~~

$$\frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} (K_M + [S]) = [S]$$

$$\frac{1}{2} K_M = [S] - \frac{1}{2} [S]$$

$$\frac{1}{2} K_M = \frac{1}{2} [S]$$

$K_M = [S]$

K_M est la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme fonctionne à la moitié de sa vitesse maximale

- K_M est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme. Plus l'affinité est élevée, et moins il faudra de substrat pour que l'enzyme fonctionne.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

On peut facilement déterminer K_M et V_{max} si l'on a les concentrations en substrats utilisées et les vitesses enzymatiques mesurées à ces concentrations.

Pour cela il faut linéariser l'équation de *Michaelis-Menten*.

Il existe plusieurs façon de procéder :

Lineweaver - Burk

Hanes

Eisenthal - Cornish-Bowden

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Lineweaver - Burk

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Si on écrit l'équation en double inverse :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{1}{\frac{[S]}{K_M + [S]}}$$

ou

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]}$$

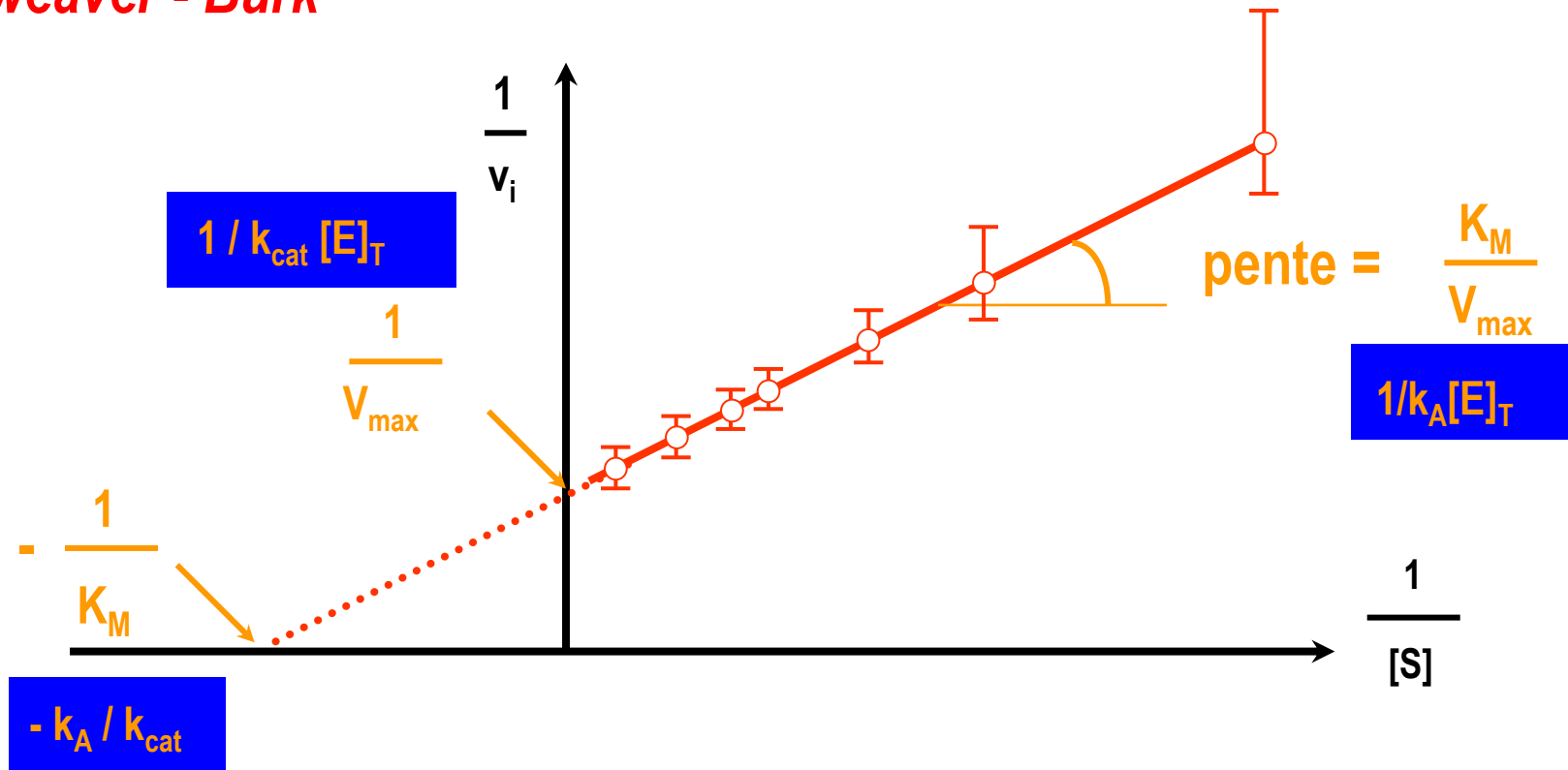
En réarrangeant on obtient :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Lineweaver - Burk



Il s'agit de la représentation **la plus utilisée par les enzymologistes** même s'il vaudrait mieux utiliser d'autres représentations plus adaptées...



3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

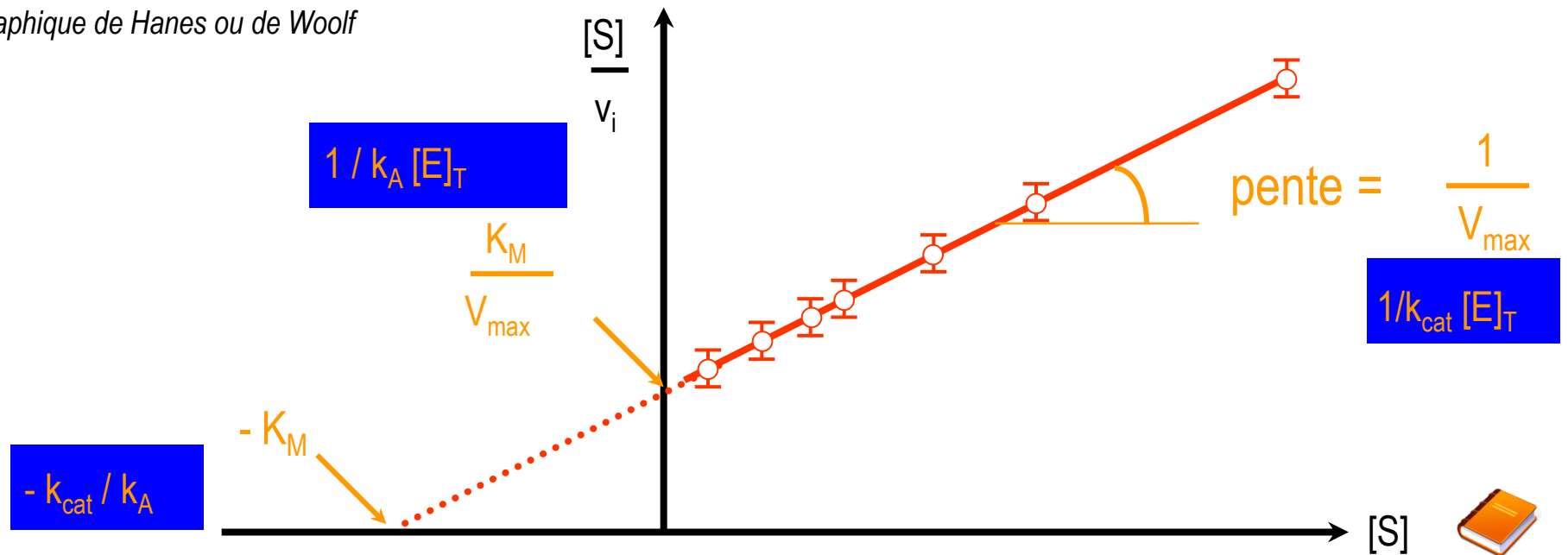
Hanes

Si on multiplie l'égalité de Lineweaver-Burk par [S] :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{devient}$$

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \times [S]$$

Graphique de Hanes ou de Woolf



3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

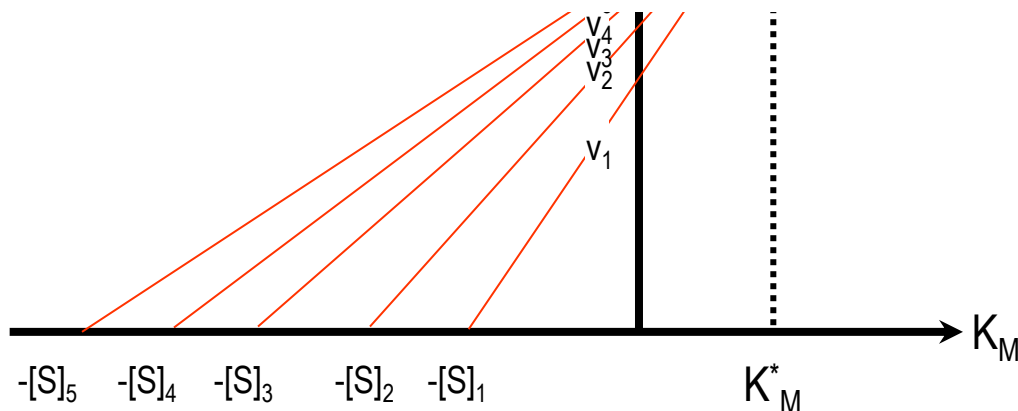
Eisenthal - Cornish-Bowden

L'équation de Michaelis-Menten peut se réécrire ainsi :

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

EXPERIMENTALEMENT

CHOIX 1



3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule

Mesure d'une quantité de produit par technique enzymatique :



Y absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée, différente de celles auxquelles absorbent S, P et X.

Objectif : quantifier S dans le sérum

Dans une cuve, 10 μl de sérum sont ajoutés à 980 μl d'une solution contenant X à 15 mM et du tampon pH 7,5.

10 μl d'enzyme sont ajoutés. La réaction est totale en 5 minutes.

La D.O. à 340 nm est alors mesurée : 0,180 ($\epsilon_{340 \text{ nm}}^Y = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Calculer la concentration en S dans le sérum (gamme normale 1 à 4 mM).

3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule

Mesure d'une quantité de produit par technique enzymatique :



Y absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée, différente de celles auxquelles absorbent S, P et X.

Objectif : quantifier S dans le sérum

$$V_{\text{final cuve}} = 1000 \mu\text{L}$$

$$A_{340 \text{ nm}} = 0,180$$

$$[Y]_{\text{cuve}} = [S]_{\text{cuve}} = 0,180 / 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} = 30 \cdot 10^{-6} \text{ mole/L.}$$

$$\text{Qté de S dans la cuve} = 30 \cdot 10^{-6} \text{ mole/L} \times 1 \cdot 10^{-3} \text{ L (1000 } \mu\text{L)} = 30 \cdot 10^{-9} \text{ mole.}$$

S était dans le volume de sérum (10 μL) mis dans la cuve :

$$[S]_{\text{sérum}} = 30 \cdot 10^{-9} \text{ mole} / 10 \cdot 10^{-6} \text{ L} = \mathbf{3 \cdot 10^{-3} \text{ mole/L ou 3 mM}}$$

3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule

Mesure d'une quantité de produit par technique enzymatique :

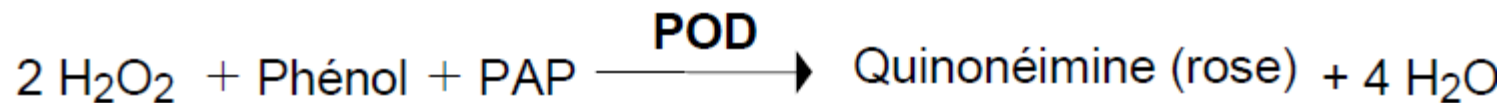
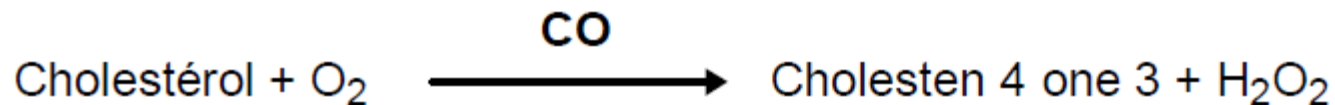
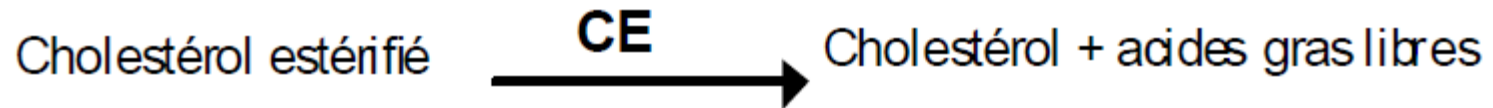


REACTIFS BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SA,
02160, Maizy, France

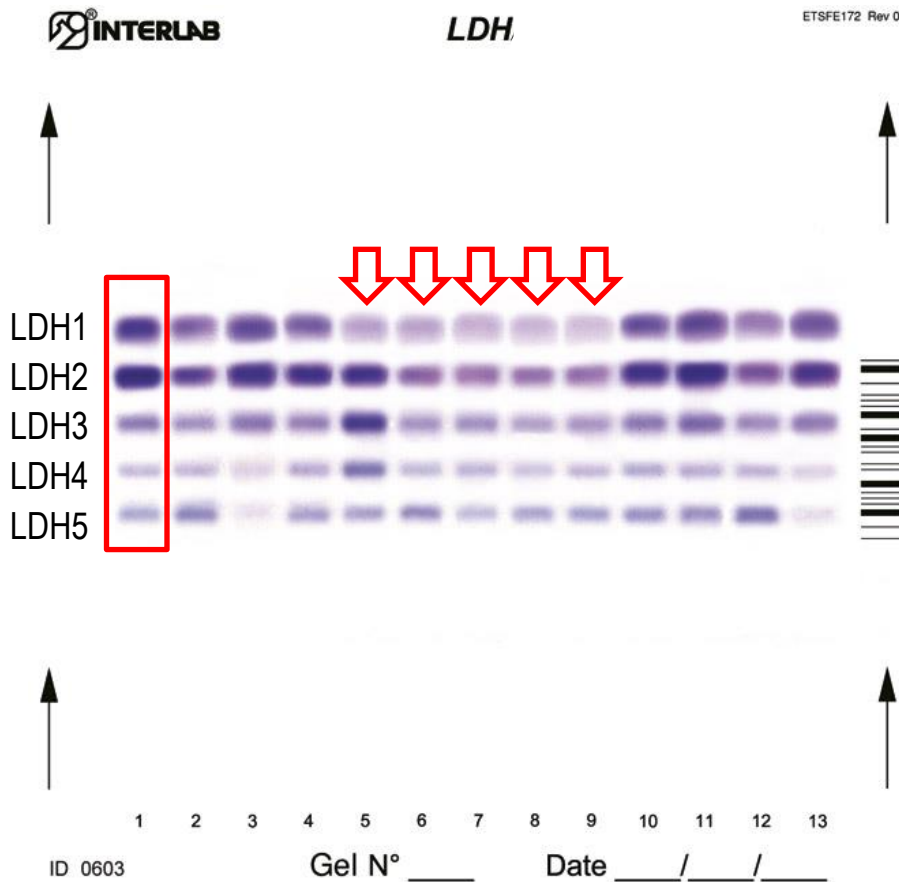
CHOLESTEROL Méthode CHOD-PAP

Réactif pour le dosage quantitatif
du cholestéro **total** dans le plasma ou le sérum humains



3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule



LDH sérique : marqueur AVC et infarctus.

