

# II – Les Enzymes

## 1 - Introduction – Définitions

## 2 - Les cofacteurs enzymatiques

A - biotine (ou vitamine B8)

B - Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>)

## 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 :

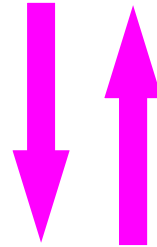
- **transitoirement** liés à l'enzyme → **co-substrats**
- **liés de façon covalente** à l'enzyme → **groupes prosthétiques**

## 2 – Les cofacteurs enzymatiques

apoenzyme  
(inactif)

+

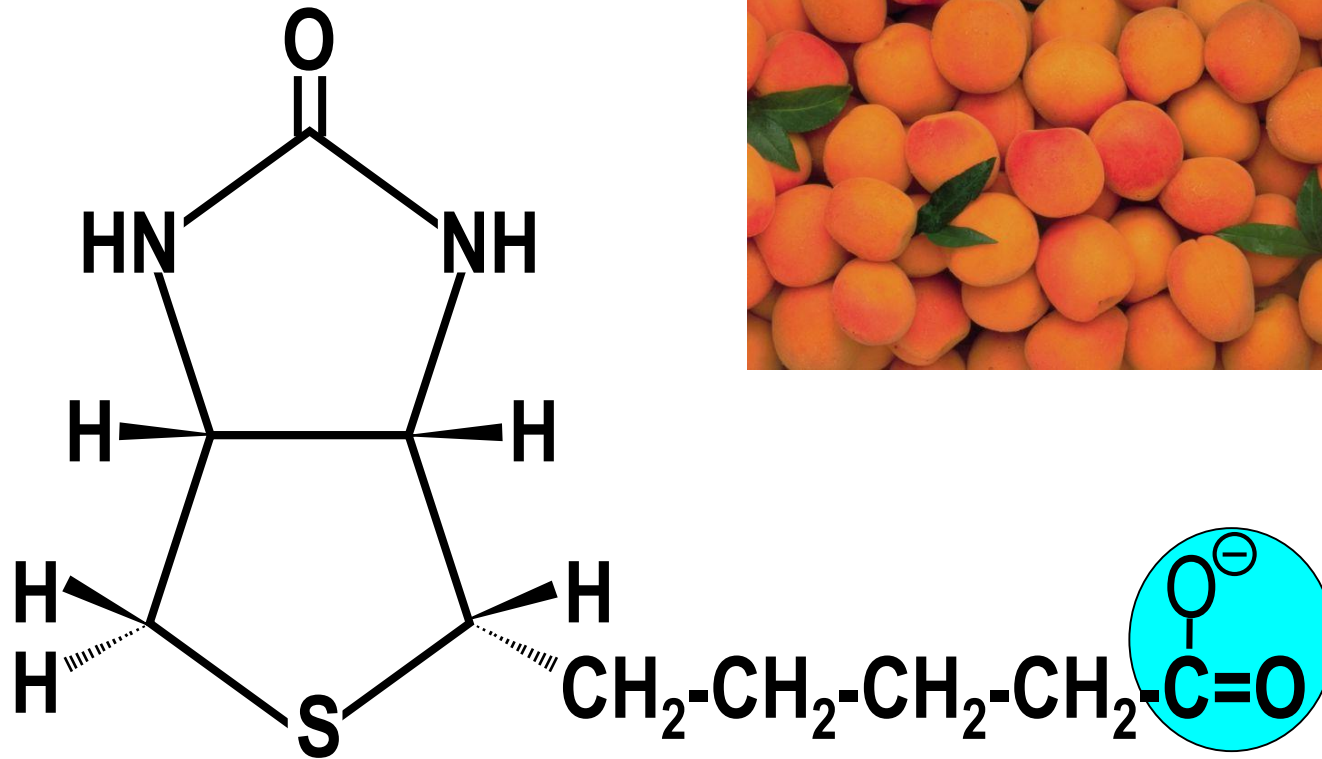
cofacteur



holoenzyme  
(actif)

## 2 – Les cofacteurs enzymatiques

### A - biotine (ou vitamine B8)



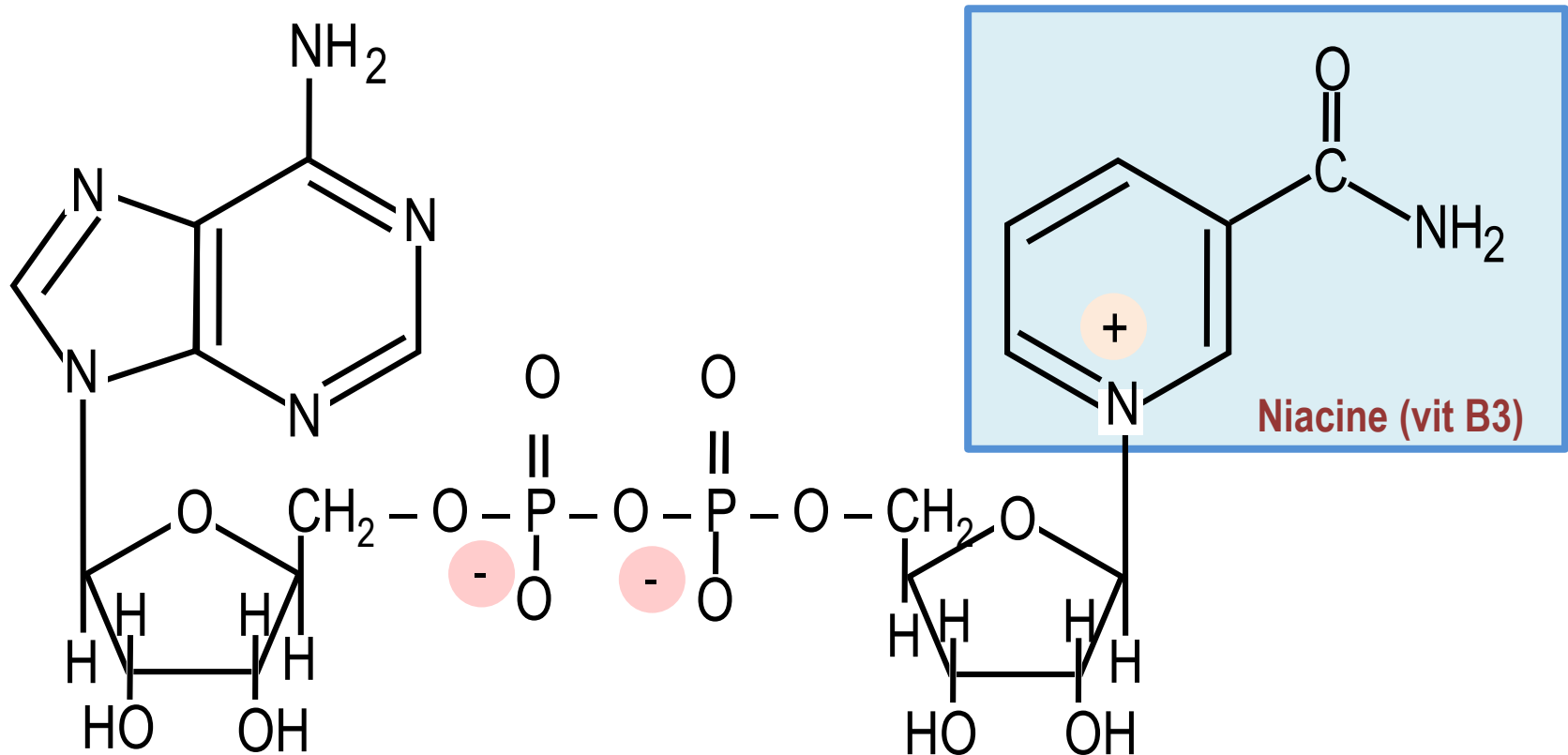
Liaison avec fonction  
amine d'une lysine

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



## 2 – Les cofacteurs enzymatiques

### B - Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>)



**Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD<sup>+</sup>)**



## 3 – La réaction enzymatique

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



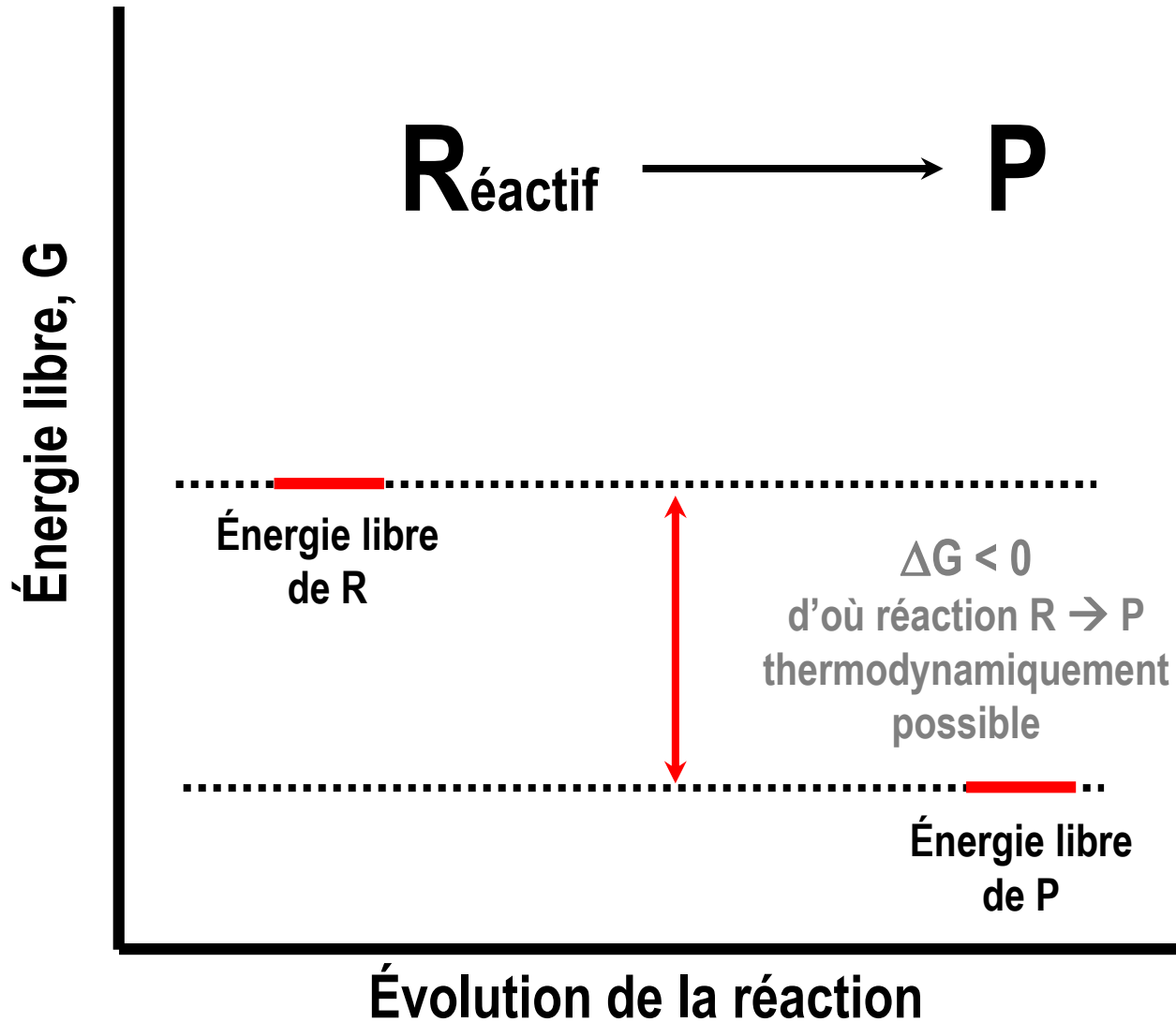
S : substrat

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 ( $\Delta G$  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

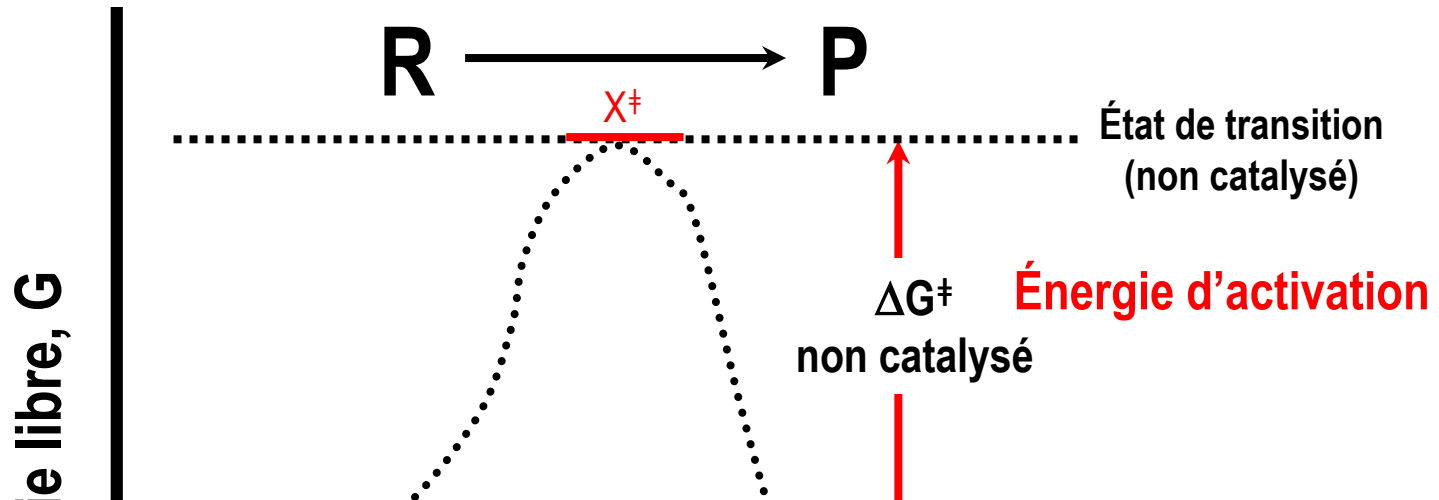
# Pourquoi ?

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.



## 3 – La réaction enzymatique

### A - réaction non-catalysée

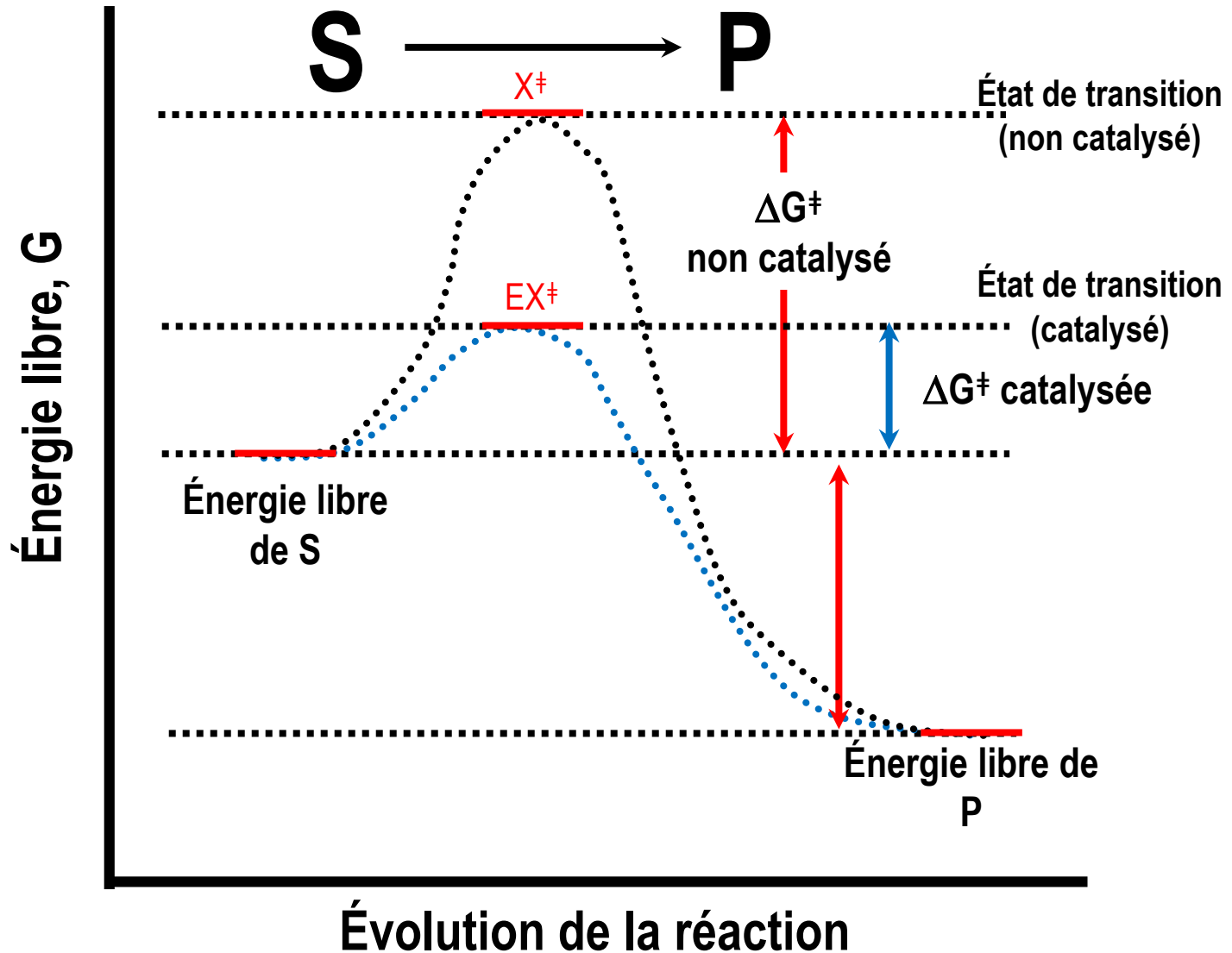
L'état de transition  $X^\ddagger$  n'est obtenu en quantité que **pour des températures très élevées.**

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

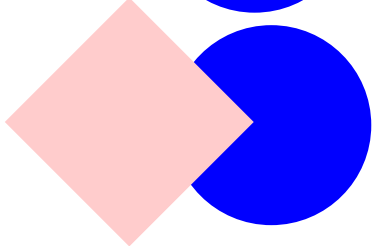
#### B - catalyse enzymatique



### 3 – La réaction enzymatique

#### B - catalyse enzymatique

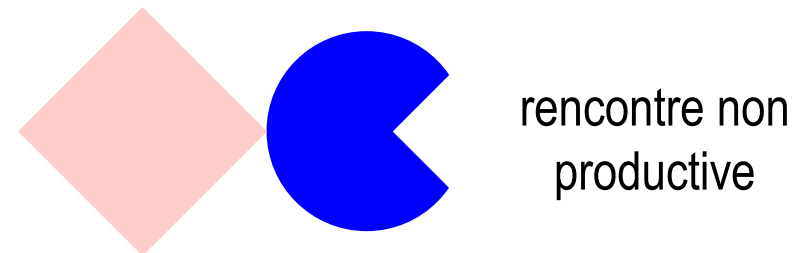
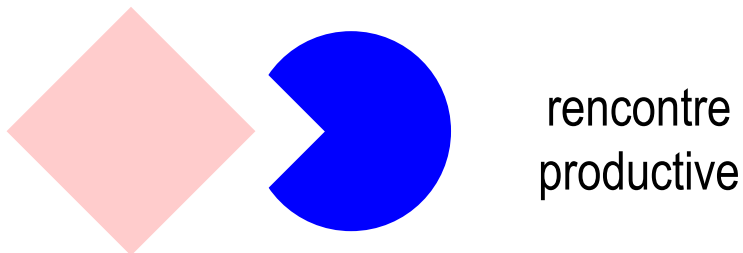
Soit :  S1 et  S2 , 2 molécules pouvant réagir ensemble

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.

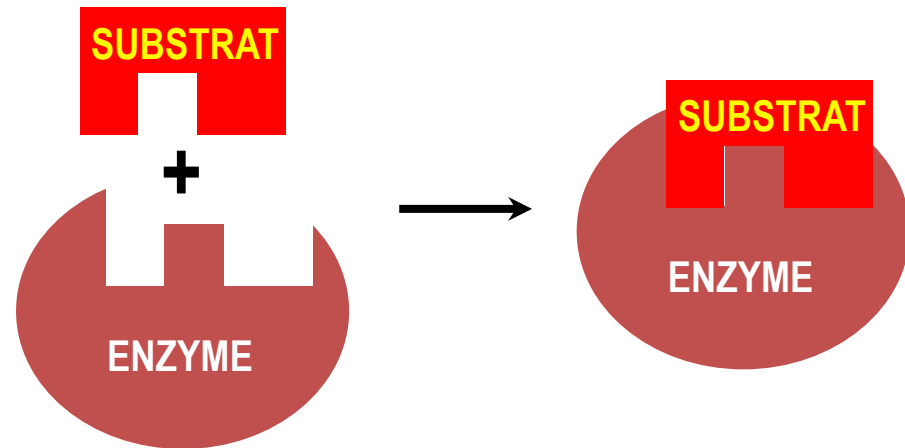
### 3 – La réaction enzymatique

#### B - catalyse enzymatique

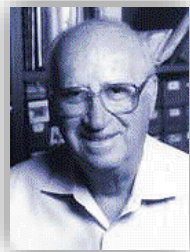
##### 1894 MODELE DE FISHER : CLE-SERRURE



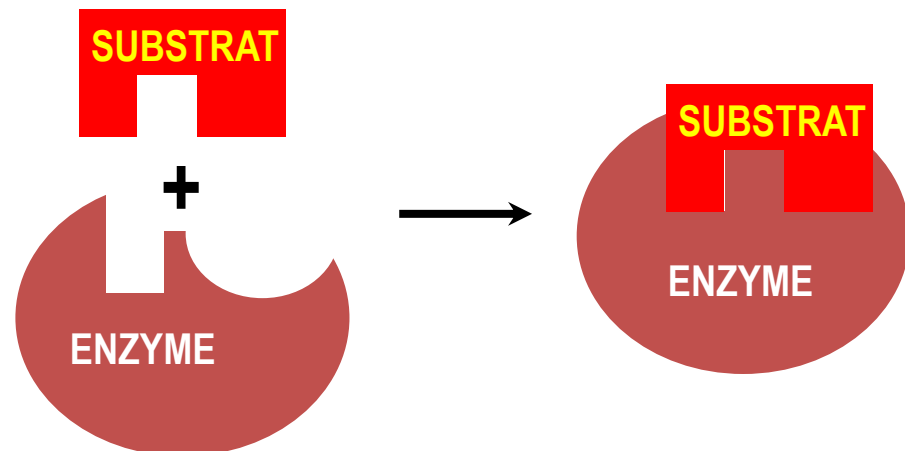
Hermann Emil Fischer



##### 1958 MODELE DE KOSHLAND : AJUSTEMENT INDUIT



Daniel Koshland Jr.



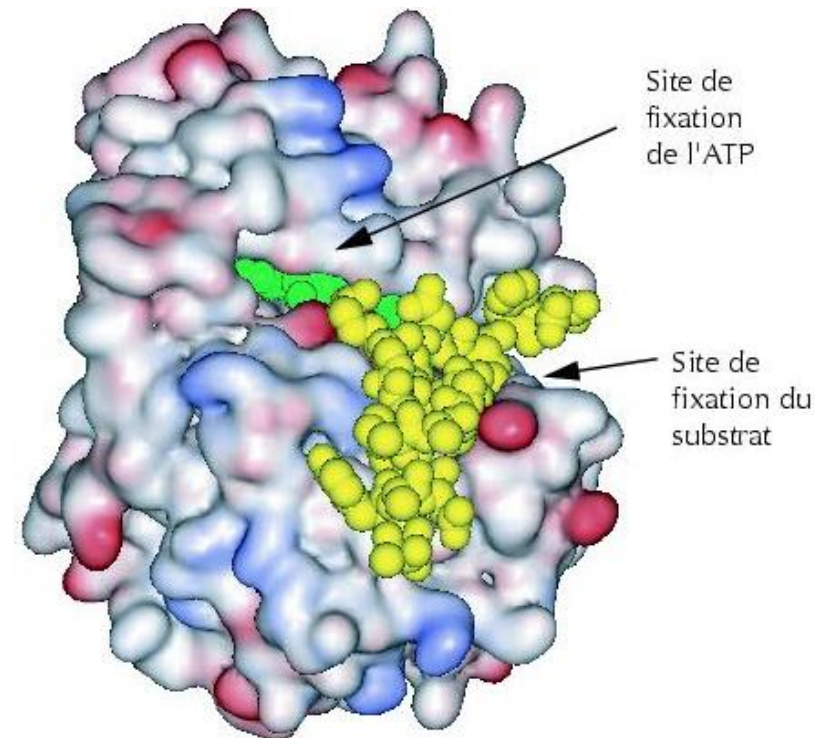
## 3 – La réaction enzymatique

### 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.*

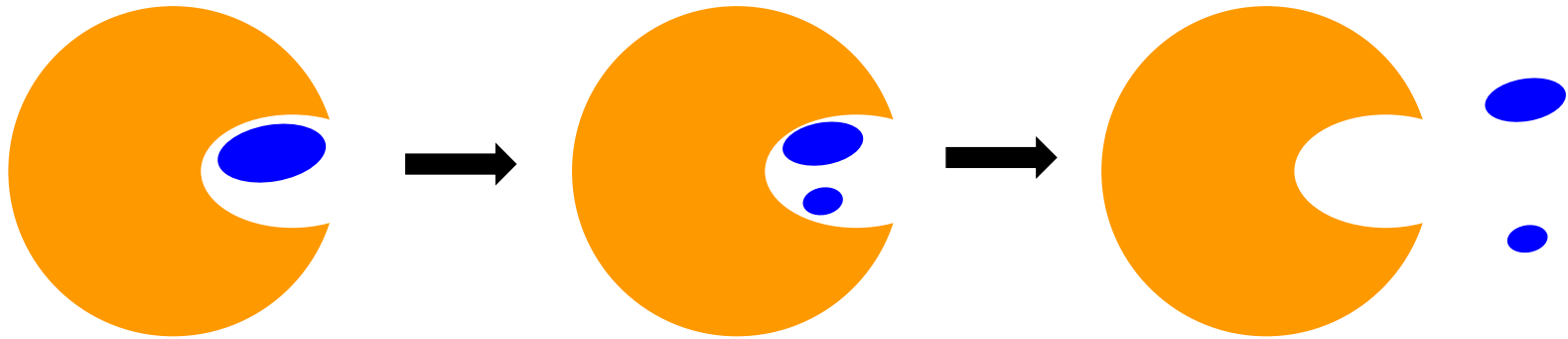
*Rouge régions négatives et bleu régions positives.*



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

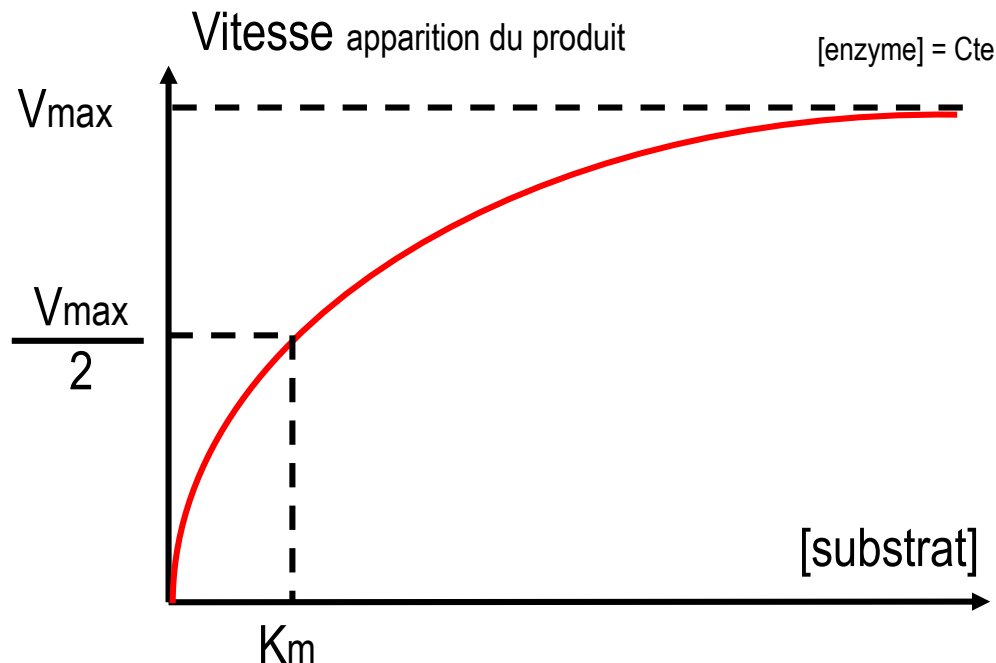
Pour une molécule d'enzyme donnée, le nombre de réactions catalysées par unité de temps est donc un nombre fini (de 10 à  $10^6$ /sec).

## 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<sup>ère</sup> canadienne à  
être médecin en  
1913.

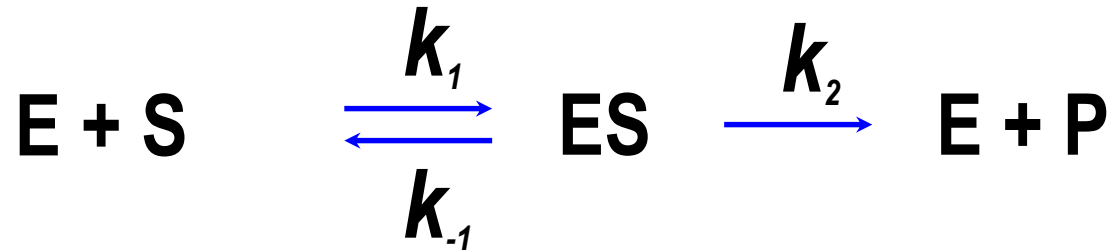


**Leonor Michaelis,**  
Université de Berlin,  
Professeur de biochimie à  
Nagoya au Japon,  
Professeur au «Rockefeller  
Institute of Medical  
Research» à New York .

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.

$$v_i = k_2 [\text{ES}]$$

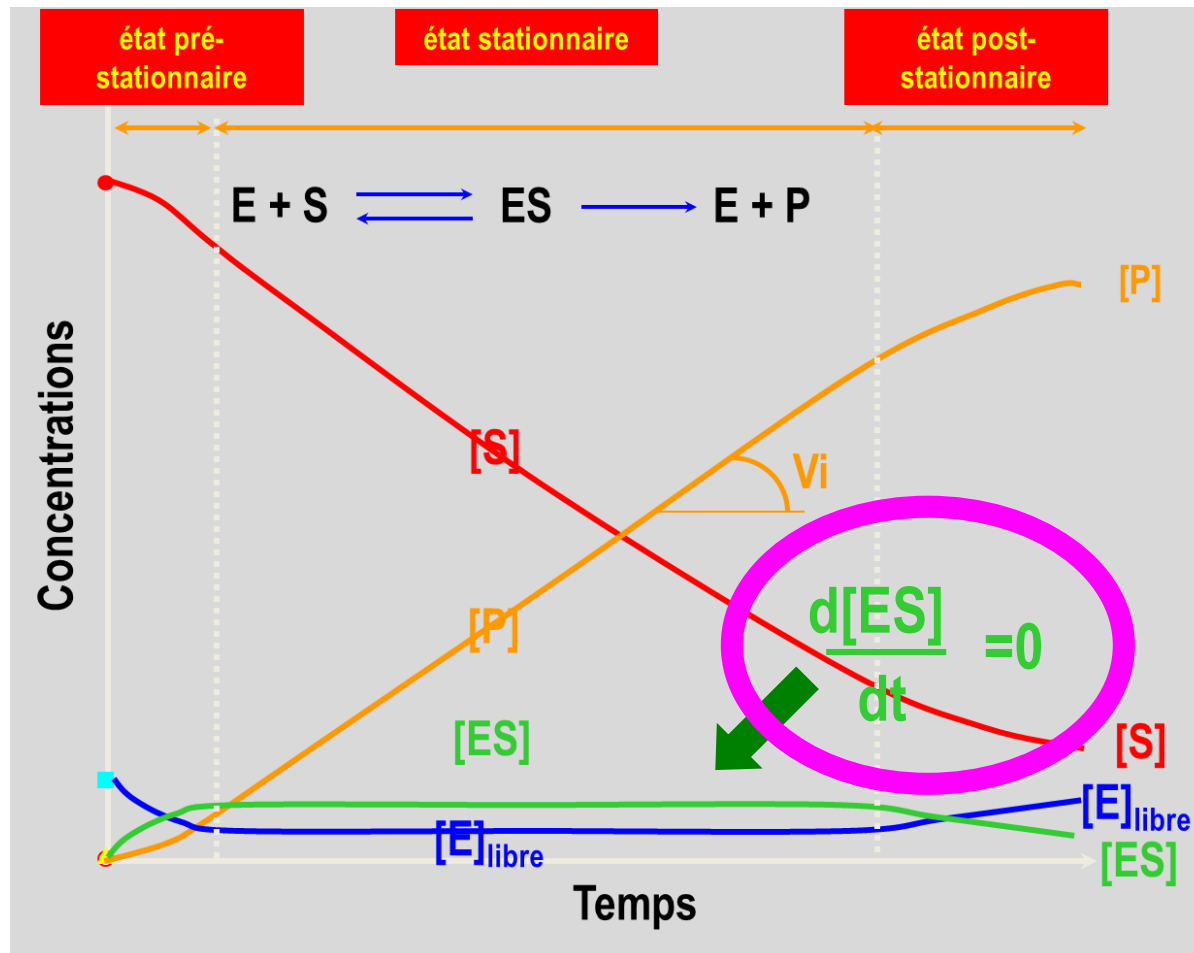
La [ES] dépend de sa vitesse de formation et de sa vitesse de disparition.

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

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

### 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

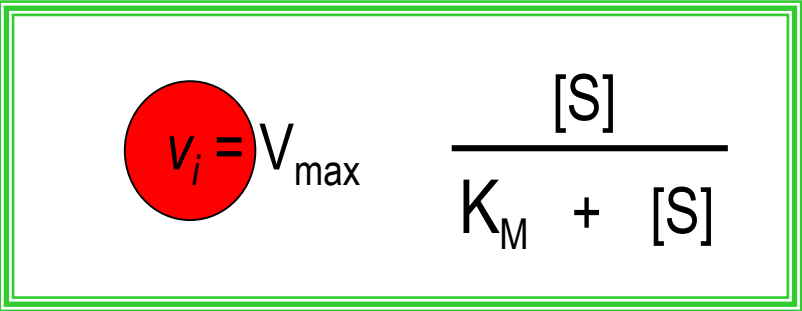
$$v_i = k_2 [E]_T \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

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

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

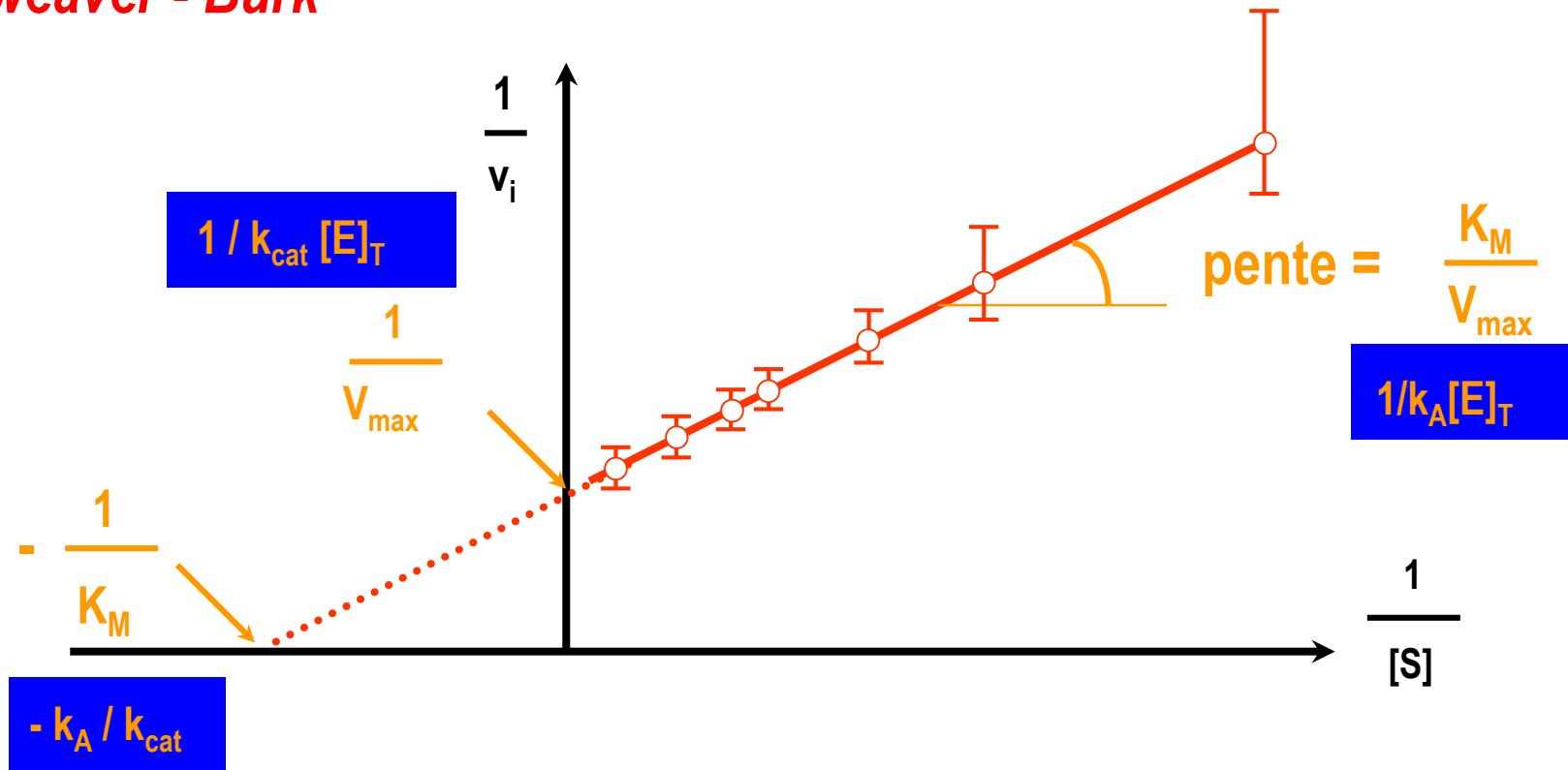
En réarrangeant on obtient :

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

### 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

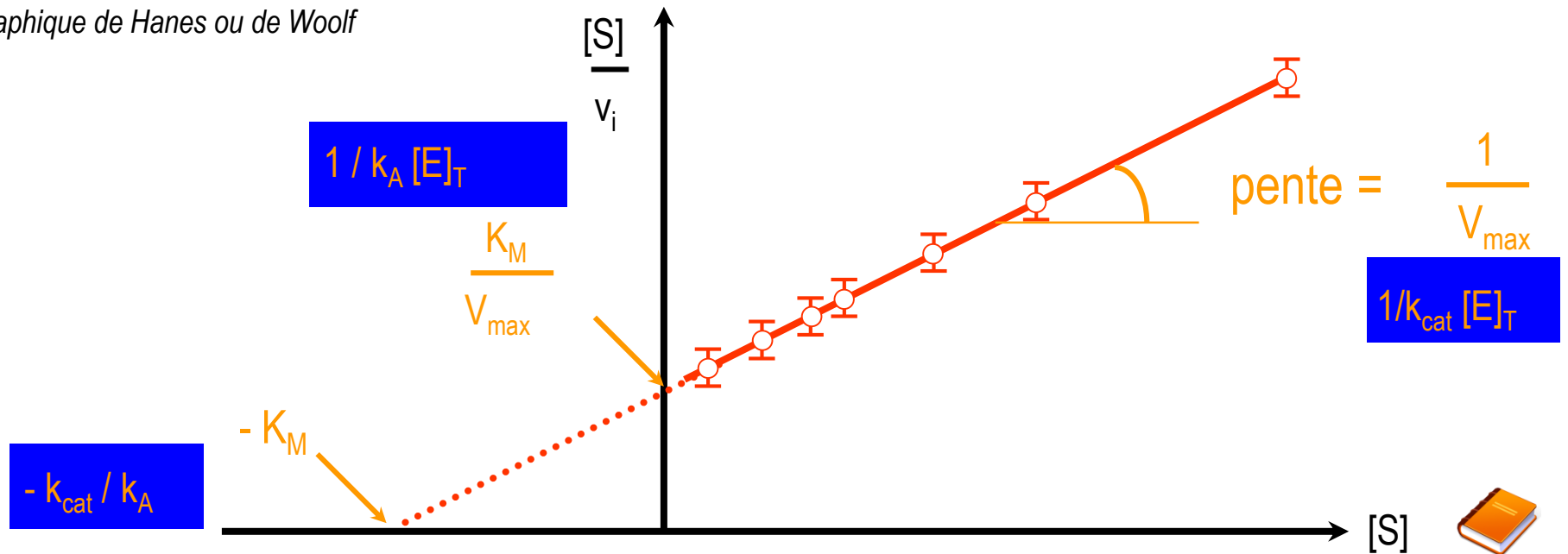
#### Hanes

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

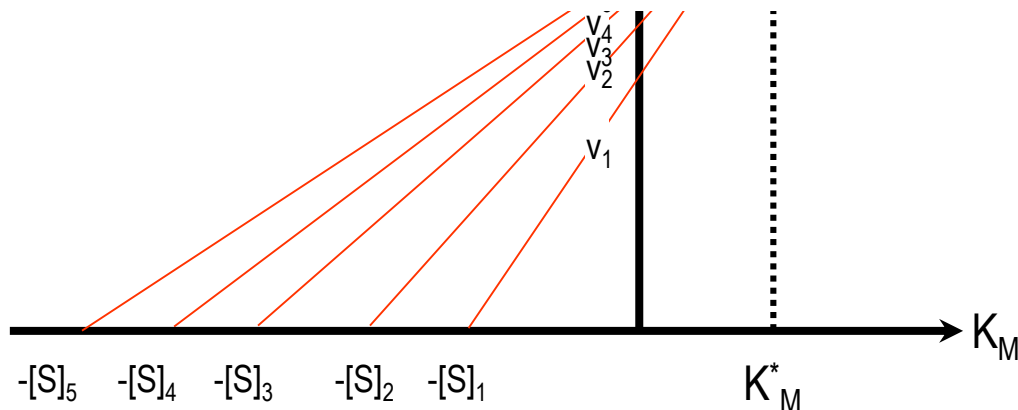
#### D - introduction à la cinétique enzymatique

#### *Eisenthal - Cornish-Bowden*

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

# 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  $\mu\text{l}$  de sérum sont ajoutés à 980  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant X à 15 mM et du tampon pH 7,5.

10  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{L}$ ) 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 :

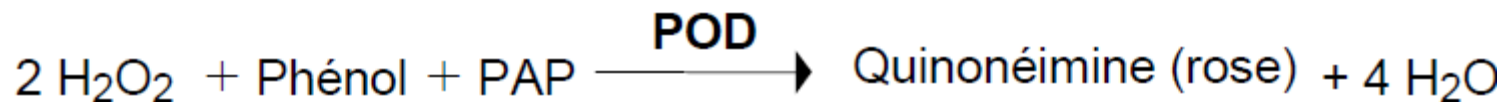
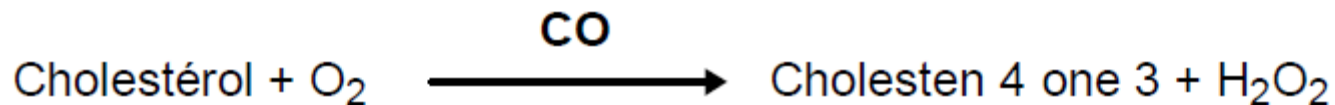
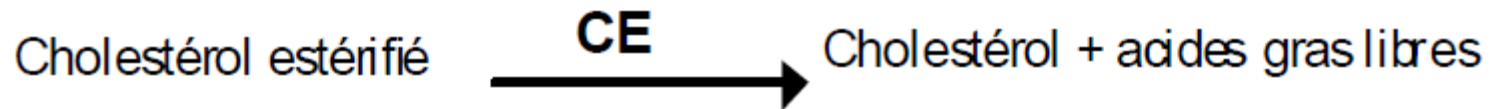


REACTIFS BIOLABO  
www.biolabo.fr

FABRICANT :  
BIOLABO SA,  
02160, Maizy, France

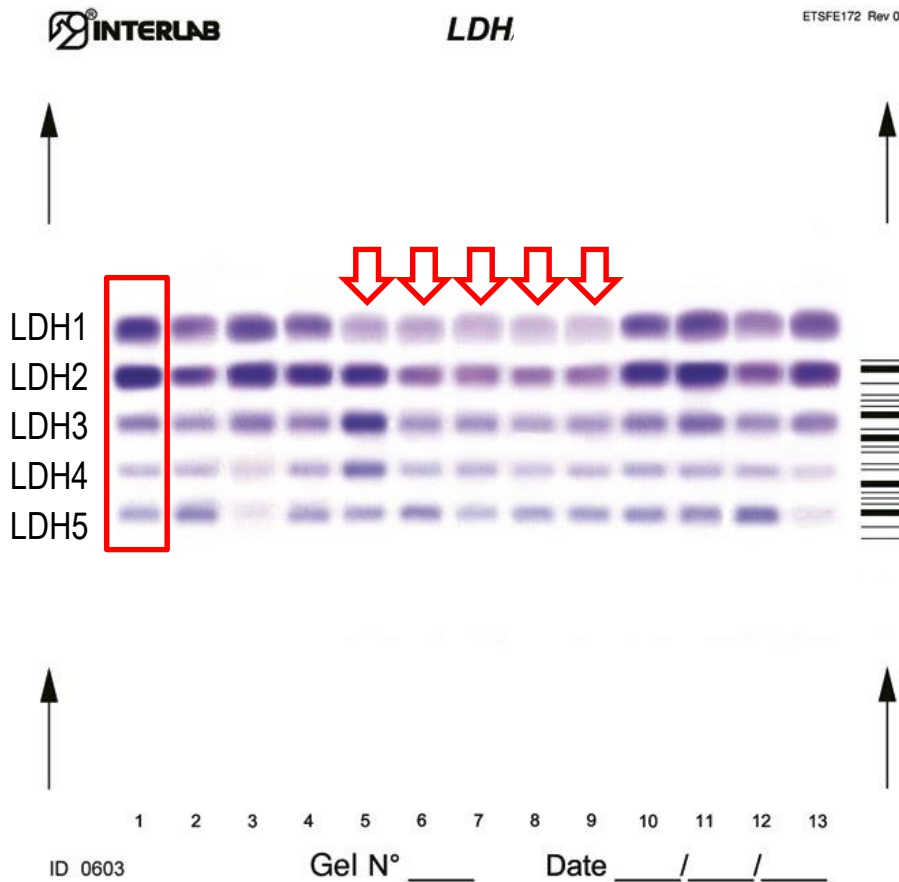
#### CHOLESTEROL Méthode CHOD-PAP

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.

