

COURS ET TRAVAUX DIRIGÉS EN

Enzymologie et Bioénergétique

A. ENZYMOLOGIE

I. INTRODUCTION

II. CINÉTIQUE ET VITESSE DE RÉACTION

III. MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

IV. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

B. BIOÉNERGÉTIQUE

I. NOTIONS DE THERMOCHIMIE ; RAPPELS

II. RÉACTIONS D'OXYDORÉDUCTION

III. COMPOSÉS RICHES EN ÉNERGIE, COUPLAGE ÉNERGÉTIQUE

IV. ÉNERGÉTIQUE DU TRANSPORT MEMBRANAIRE

18 heures de cours (9×2). 72 heures de TD (42×2 ; 6 groupes, 6 séances/groupe

ENZYMOLOGIE

I.INTRODUCTION

Un enzyme est une macromolécule de STRUCTURE PROTÉIQUE dont la fonction est de CATALYSER des réactions biochimiques.

A l'origine on avait pensé que cette propriété était propre au phénomène du vivant ; aujourd'hui, il est bien acquis que l'activité catalytique des enzymes peut s'exercer dans un tube à essai en dehors de tout système vivant.

ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.1. Les enzymes dans l'antiquité

-2100 av. J.-C. Hammourabi ; codification de la fermentation du raisin et de la fabrication du vin

- Les sociétés anciennes et le caillage du lait :

> la présure et la rénine extraites du quatrième estomac de jeunes ruminants

> la ficine du figuier

On peut même trouver une référence à la ficine dans l'Iliade de Homère : ...*En un instant le suc du figuier fait cailler et épaissir le lait alors qu'il est liquide...*

ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.2. Les premiers jours de l'enzymologie scientifique

- Les rapports de la marine britannique dans les années 1700 sur les pratiques des habitants des îles du Pacifique pour attendrir les viandes et pour le traitement de la teigne avec les extraits du papayer ont suscité un grand intérêt scientifique en Europe du dix-huitième siècle. On pense que ce fut un des facteurs déclenchant des études systématiques sur les enzymes digestifs qui ont suivi.

ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.2. Les premiers jours de l'enzymologie scientifique

- Le scientifique français Réaumur (1683-1757)
- Spallanzani (1729-1799) .
- En 1897 les frères Buchner.
- À la même époque Kuhne a donné le nom d'*enzyme*.
- Le mot enzyme vient du grec enzymos qui définit le processus du levage de la pâte de boulangerie.

ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.3.Le mécanisme de l'action enzymatique

- **Au tout début du vingtième siècle Emile Fischer proposa la formation du complexe enzyme-substrat.**
- **O'Sullivan et Tompson ont montré que l'invertase se liait au sucre de canne avant le processus de l'inversion et que cette liaison protégeait l'enzyme de la dénaturation thermique.**

ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.3.Les modèles mathématiques de la cinétique enzymatique

- En **1903 Victor Henri** a publié le premier modèle mathématique qui décrit avec succès les résultats des cinétiques enzymatiques.
- En **1913, Michaelis et Menten** dans une publication plus renommée ont repris et adapté le travail de Henri pour pouvoir calculer facilement les paramètres de la cinétique enzymatique. L'équation de Michaelis-Menten, plus justement l'équation de **Henri-Michaelis-Menten**, constitue aujourd'hui la clef de voûte de l'analyse enzymatique.



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

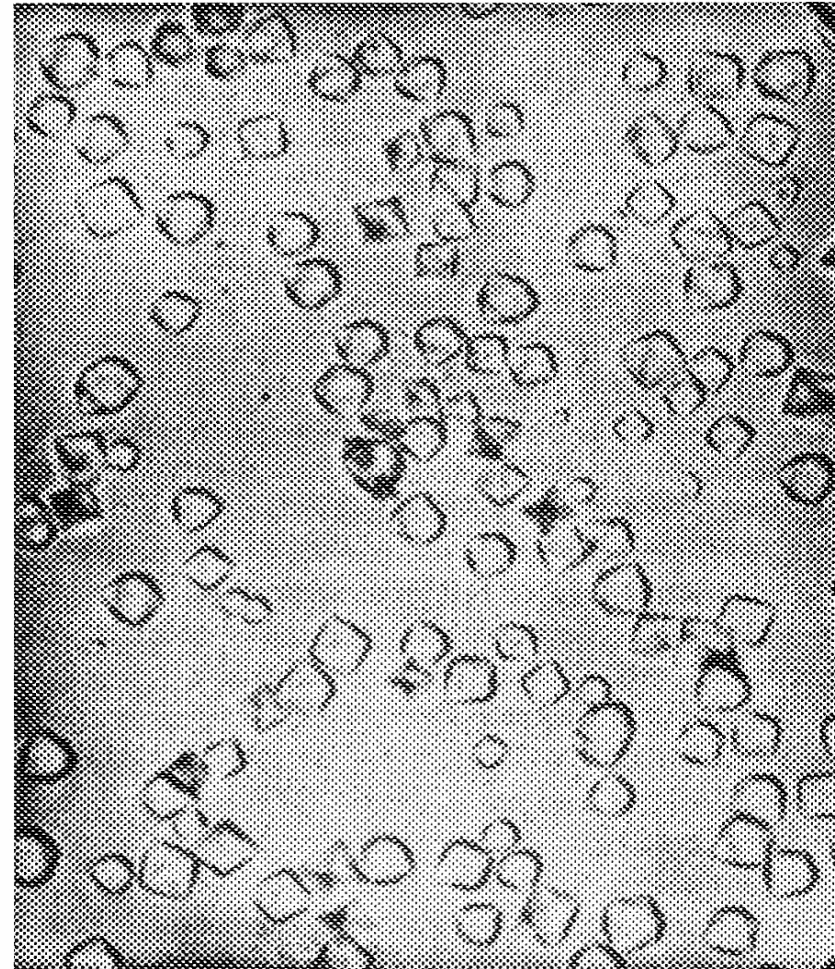
1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.3.Le caractère protéique des enzymes

Photographie des cristaux d'uréase

J.B. Sumner,

J.Biol.Chem.1926 ; 69 ; pp 435-441.



ENZYMOLOGIE INTRODUCTION.....

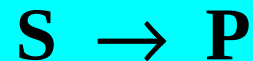
1.Un Historique bref de l'enzymologie.

1.3.L'importance socio-économique des enzymes

Médicament / Inhibiteur	Maladie / Condition	Enzyme cible
Captopril	Hypertension	Enzyme de conversion de l'angiotensine
Aspirine, Ibuprofène	Inflammation, douleur,	Prostaglandine synthase
Norfloxacin	Infections urinaires	ADN gyrase bactérienne
Lovastatine	Hypercholestérolémie	HMG CoA réductase
Allopurinol	Goûte	Xanthine oxydase
Méthotexate	Cancer	Dihydrofolate réductase
Zidovudine	SIDA	Transcriptase réverse du VIH

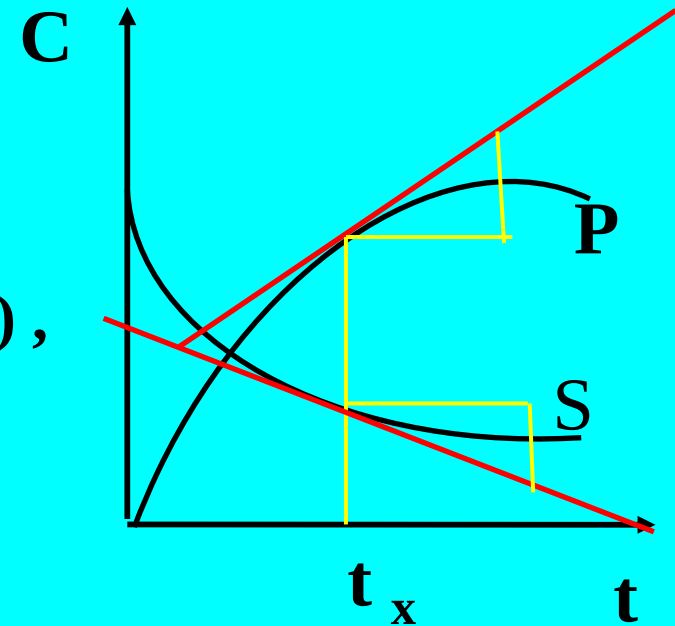
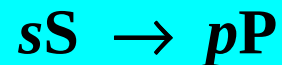
II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

1. Définition et calcul de vitesse



en un point donné t_x de la courbe $C = f(t)$,
 $v = -d[S]/dt = +d[P]/dt$.

D'une manière générale



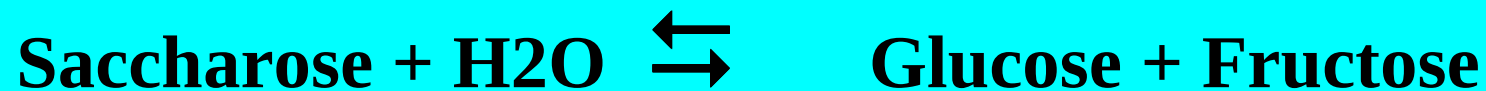
$$-\frac{1}{s} \cdot \frac{d[S]}{dt} = +\frac{1}{p} \cdot \frac{d[P]}{dt}$$

Mais
toujours

$$v = -\frac{d[S]}{dt}$$

II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

Exemple : l'hydrolyse du saccharose



DOSAGE. Disponibilités techniques. Soit le substrat , soit le produit . Mais il faut connaître la stœchiométrie de la réaction .

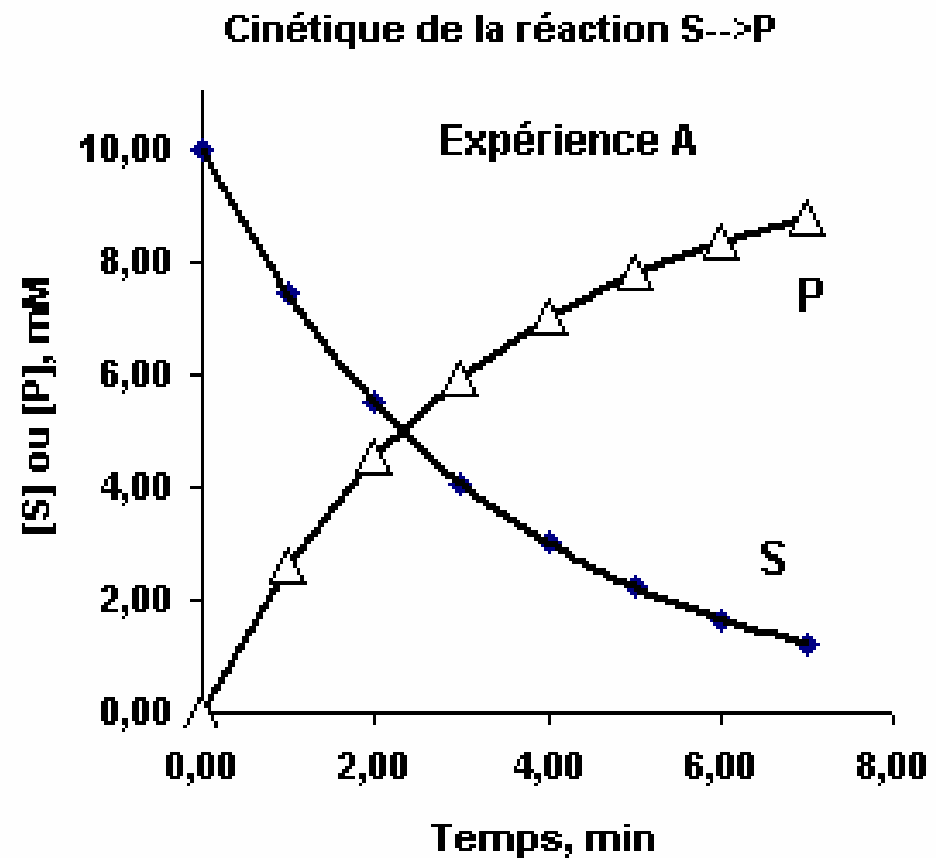
La vitesse de la réaction s'exprime toujours par

$$\underline{v = -d[S]/dt .}$$

II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

Résultats

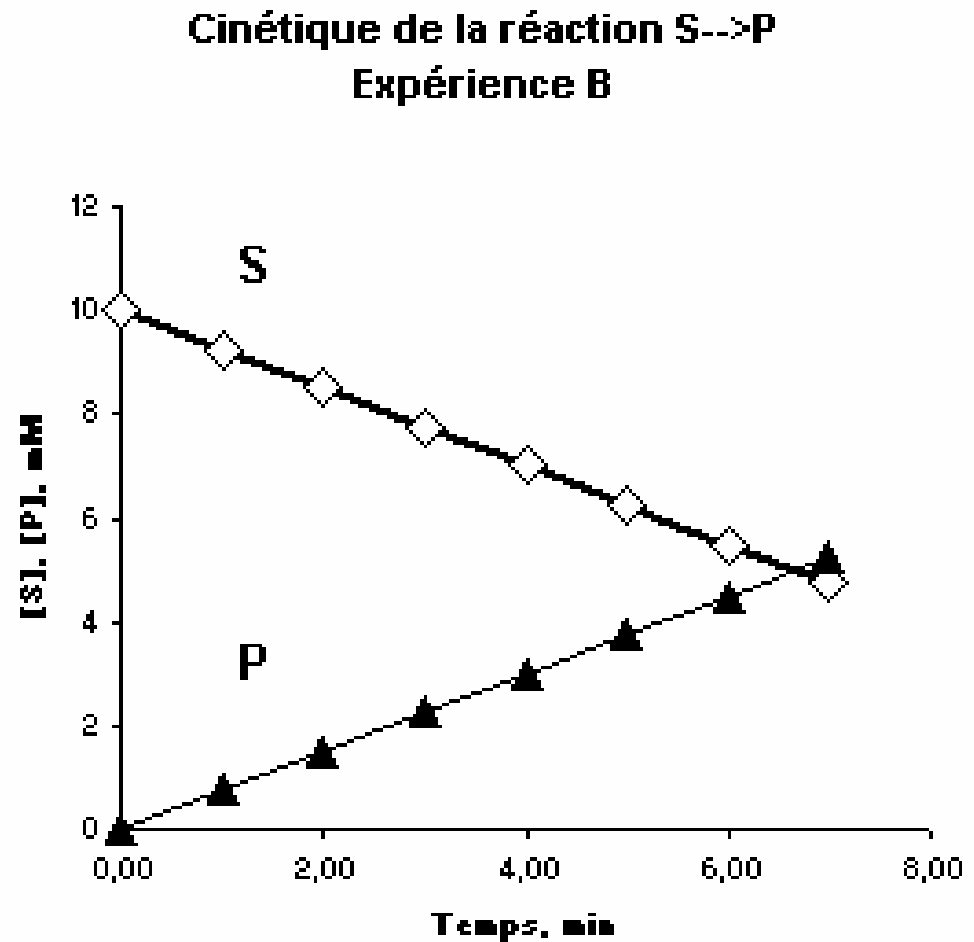
T, min	[S] / [P]
t0	C0
t1	C1
t2	C2
t3	C3
t4	C4
t5	C5
t6	C6
t7	C7



II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

Résultats

T, min	[S] / [P]
t0	C0
t1	C1
t2	C2
t3	C3
t4	C4
t5	C5
t6	C6
t7	C7



II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

Interprétations :

Expérience A.

La vitesse de la réaction n'est pas constante, la valeur absolue de $d[C]/dt$ diminue; ceci signifie que la vitesse de la réaction dépend de la concentration du substrat.

Expérience B.

La vitesse de la réaction est constante; ceci signifie que la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration du substrat pendant toute la durée de l'expérience.

II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

Calcul de la vitesse de réaction

$$v = -d[S]/dt$$

(1)

Réaction d'ordre zéro.

Dans le cas de l'expérience B,
la cinétique est linéaire.

$$v \text{ est constante ; } v = k$$

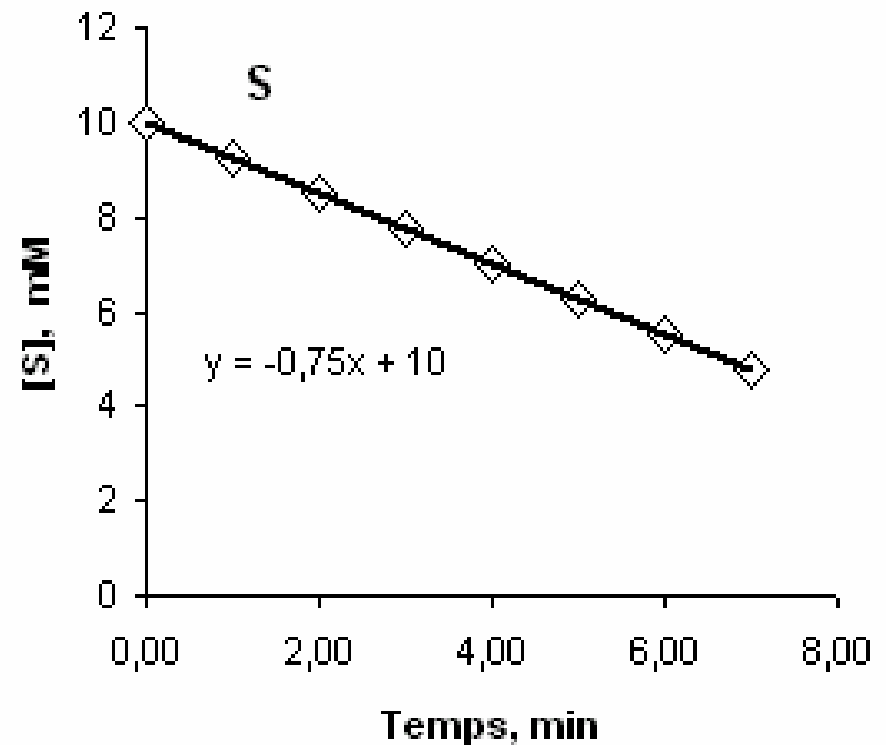
(2)

$$[S]_t - [S]_0 = -k \times t$$

(3)

k est la constante de
vitesse,
son unité est CT^{-1}

Cinétique de la réaction $S \rightarrow P$
Expérience B



II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE

Calcul de la vitesse de réaction

$$v = -d[S]/dt \quad (1)$$

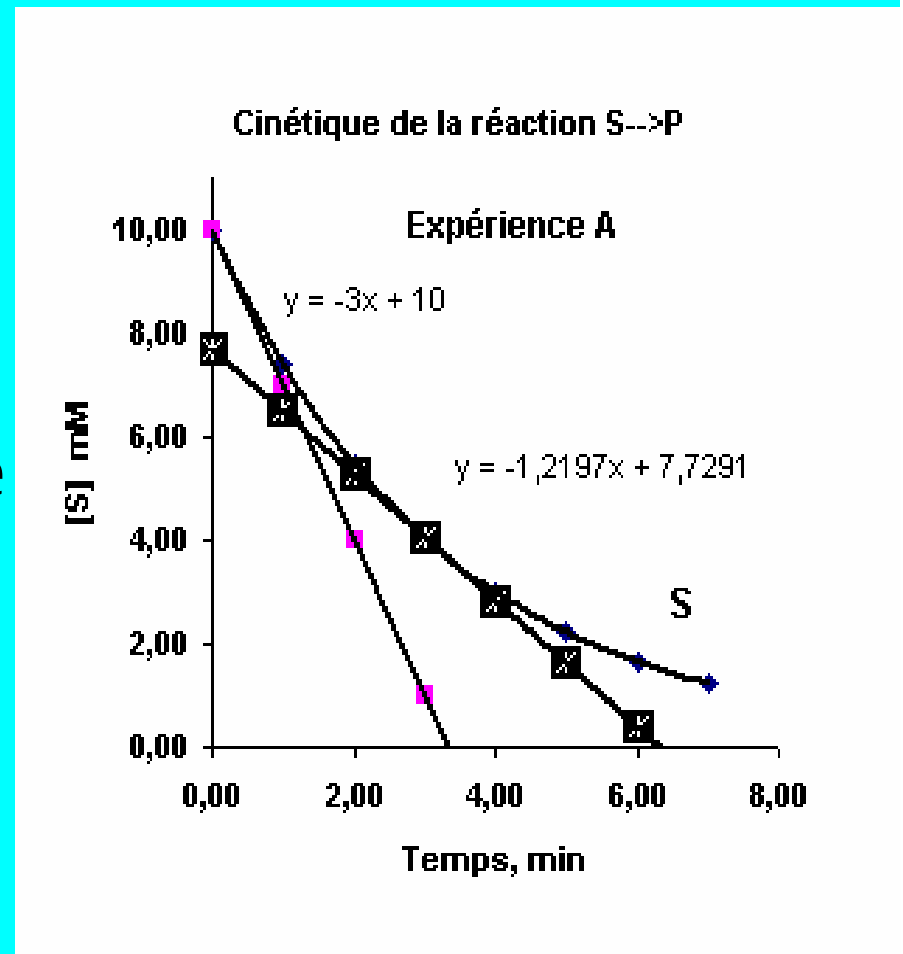
Réaction d'ordre un.

Dans le cas de l'expérience A, la cinétique n'est pas linéaire. v n'est pas constante

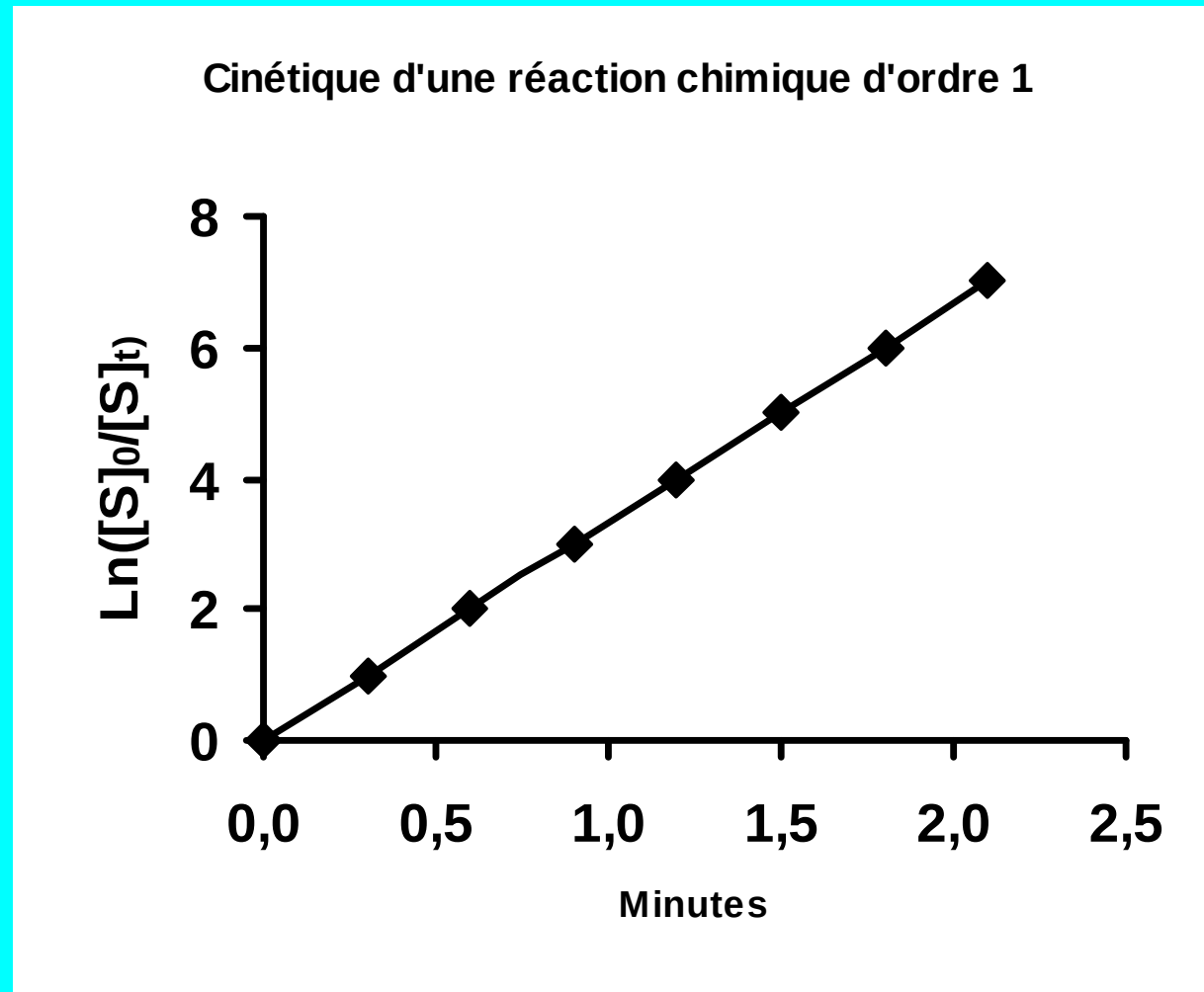
$$v = k \times [S] \quad (4)$$

$$\ln \frac{[S]_0}{[S]_t} = k \times t \quad (5)$$

k est la constante de vitesse, son unité est T^{-1}



II- CINÉTIQUE ET VITESSE D'UNE RÉACTION CHIMIQUE



CINÉTIQUE ET THERMODYNAMIQUE

2. Thermodynamique d'une réaction chimique.

On ne peut parler de vitesse de réaction que si la réaction est faisable. La faisabilité d'une réaction chimique est déterminée par la variation de son énergie libre est négative. L'énergie libre combine le premier et le deuxième principe de la thermodynamique, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Ces notions sont normalement traitées en cours de chimie et de physique, mais nous y reviendrons lors de l'étude de la Bioénergétique.

Disons simplement que la réaction $A + B \rightleftharpoons C + D$ se fait dans le sens où la variation de l'énergie libre est négative

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (6)$$

CINÉTIQUE ET THERMODYNAMIQUE

2. Thermodynamique d'une réaction chimique.

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Si ΔG est négative la réaction se fait dans le sens $A + B \rightarrow C + D$.

En revanche si ΔG est positive la réaction se fait dans le sens contraire $C + D \rightarrow A + B$

REMARQUE : Si la thermodynamique est nécessaire pour donner le sens de la réaction elle n'est pas suffisante pour indiquer sa cinétique. En d'autres termes une réaction possible peut avoir une vitesse nulle, ce qui est d'ailleurs le cas de la quasi-totalité des réactions biochimiques.

Cinétique des réactions chimiques : exercices

1-Ordre de la réaction de désintégration des isotopes radioactifs

La radioactivité d'un échantillon d'iode ^{131}I a été déterminée durant plusieurs jours. Le tableau donne le nombre de désintégrations par min (dpm) qui ont été mesurées à chaque fois :

Temps (j)	0	2	5	9	15	27
dpm	7120	6000	4640	3300	1970	700

Déterminer l'ordre de la réaction de décroissance de la radioactivité, la constante de vitesse correspondante et le temps de demie vie de l'iode ^{131}I .

Cinétique des réactions chimiques : exercices

2- Ordre de réaction de liaison d'un ligand à un récepteur protéique

On extrait de l'électroplaque de gymnote une macromolécule qui est un récepteur de l'acétylcholine. La fixation sur ce récepteur d'une neurotoxine a été étudiée au cours du temps : 13 picomoles de ce récepteur ont été incubés avec 150 picomoles de neurotoxine radioactive, dans un volume final de 8,35 mL. Après différents temps d'incubation, des parties aliquotes contenant 1,5 picomoles de récepteur étaient prélevées et filtrées sur un filtre qui retient les macromolécules (récepteur et complexe récepteur-neurotoxine). La mesure de la radioactivité retenue sur les filtres permet de calculer le nombre de picomoles de neurotoxines liées au récepteur dans chaque prélèvement :

Cinétique des réactions chimiques : exercices

Exercice 2 suite...

Temps d'incubation (min)	0	1	3	5	7	10	15	60	90
Picomoles fixées	0	0.35	0.8	1.06	1.23	1.37	1.47	1.5	1.5

Déterminer l'ordre de la réaction et sa constante de vitesse.

gymnote [Yimnct] *nom masculin* (grec *gymnos*, nu, et *nôtos*, dos)

Poisson des eaux douces de l'Amérique du Sud, à aspect d'anguille, dont une espèce, atteignant 2,50 m de long, paralyse ses proies en produisant de puissantes décharges électriques.

(c) Larousse.

Diapositive 23

MSOffice1 ; 05/03/2008

Cinétique des réactions chimiques : exercices

3- Ordre de la réaction de dénaturation thermique d'un enzyme

L'activité des enzymes dépend de leur structure tridimensionnelle. Le chauffage dénature cette structure ce qui a pour effet de diminuer l'activité enzymatique. On a étudié par chauffage à 55 °C la dénaturation thermique d'une solution d'enzyme de concentration 70 nM. Après des temps variables, on a prélevé des volumes aliquotes de la solution dans lesquels on a mesuré l'activité de l'enzyme. Cela a permis de calculer la concentration d'enzyme non dénaturé après différents temps de chauffage :

Temps à 55 °C (min)	0	5	10	15	20	30	60	∞
[Enzyme natif] (nM)	70	52	38.5	28.5	21	11.5	2	0

Déterminer l'ordre de la réaction et la constante de vitesse.

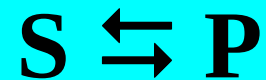
III- MECANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

1. Définition d'un catalyseur

- Un catalyseur est un facteur physique, physicochimique ou une molécule qui augmente la vitesse d'une réaction chimique.**
- L'état du catalyseur à la fin de la réaction reste inchangé comparativement à son état avant la réaction**

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

2- Etat de transition et énergie d'activation



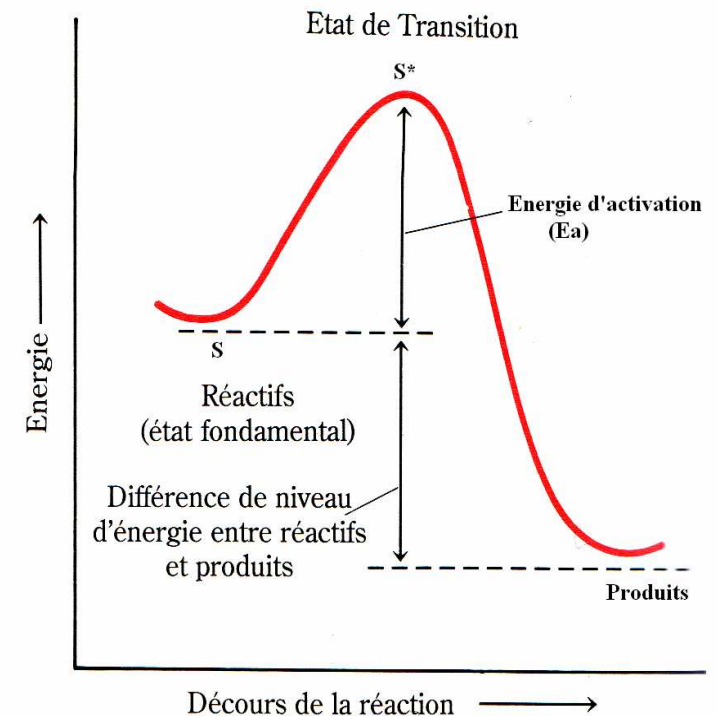
$$\Delta G_0 = -RT \ln \frac{[S^*]}{[S]}$$

(7)

$$[S^*] = [S] \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

(8)

Profil d'une réaction simple. Le niveau énergétique maximal correspond à l'état de transition de la réaction. La différence de niveau énergétique entre l'état initial et l'état de transition représente l'énergie d'activation. La différence de niveau énergétique entre substrats et produits fixe le sens de la réaction.



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

$$v = \frac{k_B \times T}{h} \quad (9)$$

k_B est la constante de Boltzmann: $1,3807 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$

h est la constante de Planck: $6,26 \times 10^{-34} \text{ J.s}$

Equation
d'Arrhenius

(10)

$$-\frac{d[S]}{dt} = v[S^*] = [S] \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right)$$

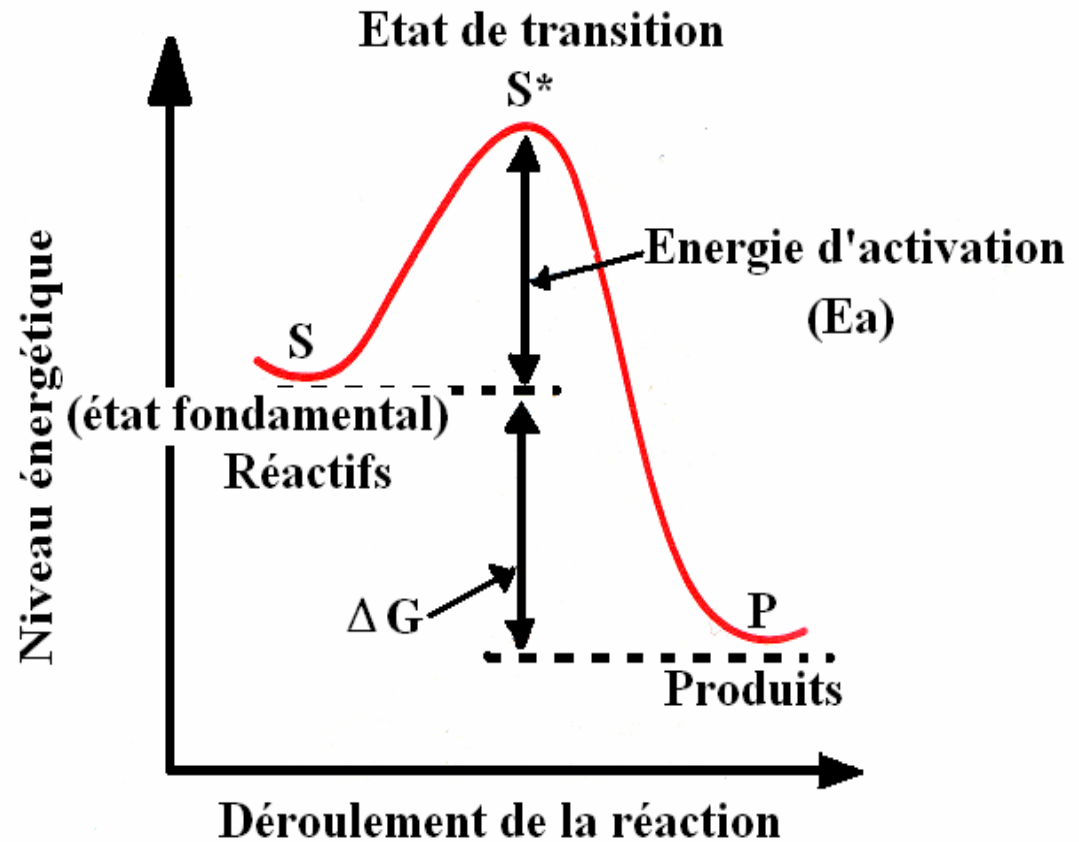
(11)

$$k = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right)$$

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

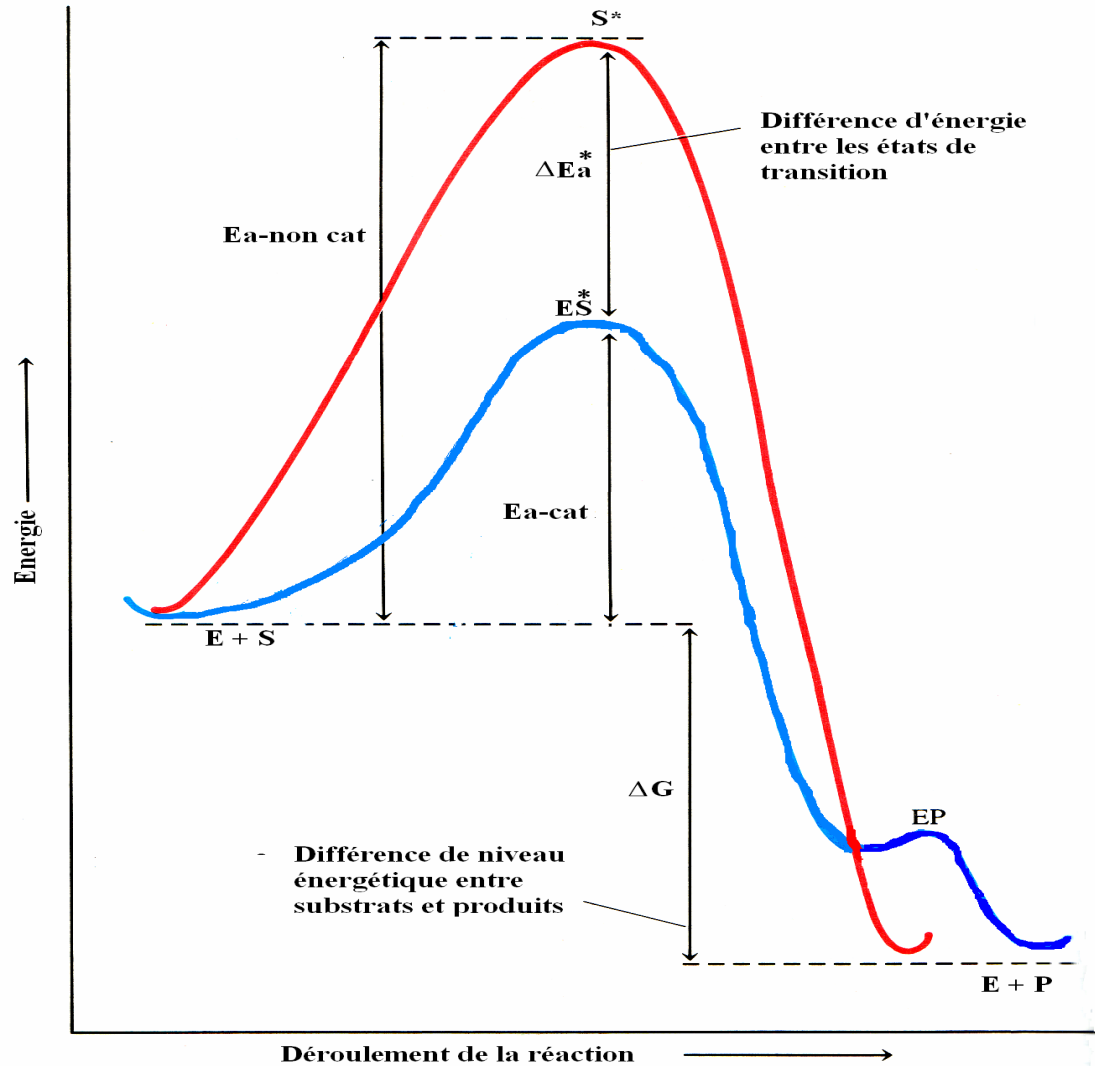
Énergie D'activation

Profil énergétique du déroulement d'une réaction simple



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

**Le
Catalyseur
Diminue
L'énergie
D'activation**



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

Réaction des esters de phénol avec un ion carboxylate.

La réaction de l'anion carboxylate sur un ester de phénol, pour donner un anhydride d'acide, illustre bien l'importance de l'effet de voisinage dans l'activité catalytique

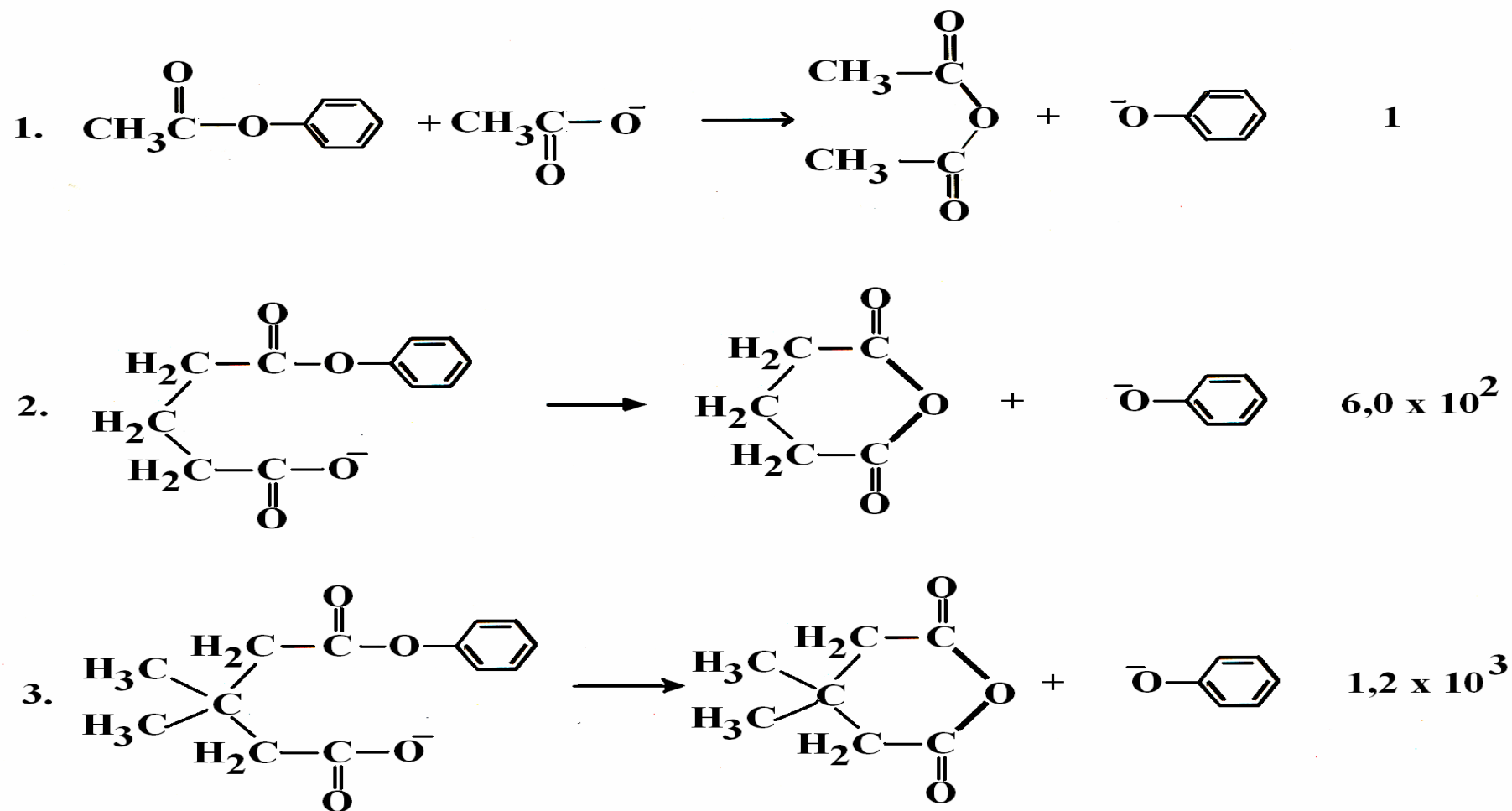
III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

A chaque modification de structure qui place des groupes réactionnels voisins dans une configuration plus rigide avec une orientation adéquate favorable à la réaction, correspond une élévation de la vitesse de réaction

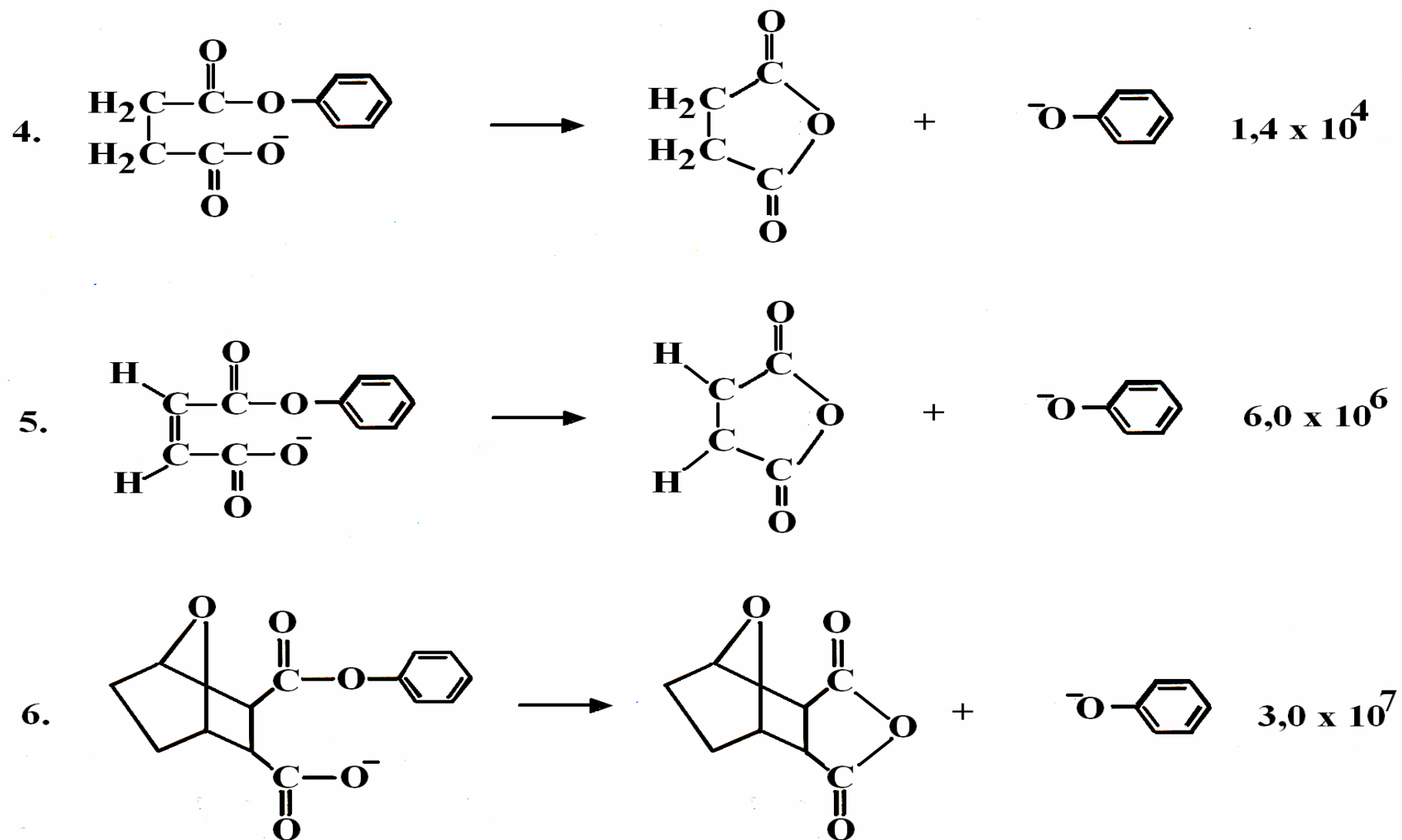
Réaction des esters de phénol avec l'ion carboxylate

Réaction

Vitesse relative



Réaction des esters de phénol avec l'ion carboxylate



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Efficacité de la catalyse enzymatique**

Le même mécanisme rend compte de l'activité catalytique des enzymes. En effet, une des étapes fondamentales dans la catalyse enzymatique est la formation d'un complexe ***Enzyme-Substrat (ES)***. La liaison du substrat à l'enzyme décroît sa mobilité, donc son entropie. Ainsi les niveaux d'entropie des substrats et des produits sont plus proches l'un de l'autre et la réaction correspondante plus rapide. C'est leur pouvoir d'abaisser l'entropie des réactions qui a fait qualifier les enzymes de puits à entropie.

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Efficacité de la catalyse enzymatique

Réaction	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	$E_a, \text{cal.mol}^{-1}$
Catalyseur	Métallique	$E_{a_{\text{met}}} = 11.700$
Catalyseur	Catalase	$E_{a_{\text{enz}}} = 2.000$

L'équation (11) vous permet de calculer le rapport des deux constantes de vitesses k_e/k_m

$$k = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp \left(- \frac{E_a}{RT} \right)$$

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Efficacité de la catalyse enzymatique

$$\frac{k_{enz}}{k_{met}} = \frac{\frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{E_{a_{enz}}}{RT}\right)}{\frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{E_{a_{met}}}{RT}\right)}$$

$$\frac{k_{enz}}{k_{met}} = \exp\left(\frac{E_{a_{met}} - E_{a_{enz}}}{RT}\right)$$

$$\frac{k_e}{k_m} = \exp\left(\frac{(11.700 - 2.000)\text{calmol}^{-1}}{1,987\text{calmol}^{-1}\text{K}^{-1} \times 303\text{K}}\right) = 10^7$$

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

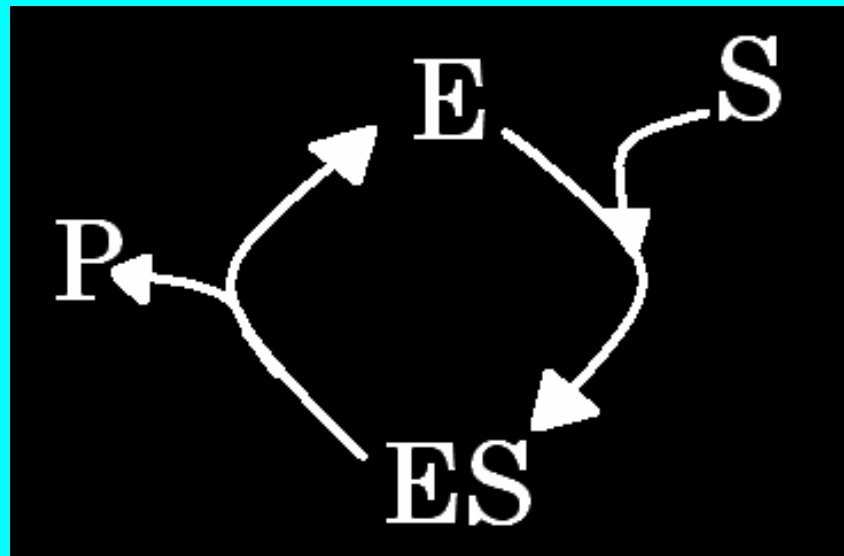
- **Exercice d'application**

L'uréase augmente la vitesse d'hydrolyse de l'urée à pH 8.0 et à 20 °C par un facteur de 10^{14} . En présence d'uréase à pH 8.0 et à 20 °C, une certaine quantité d'urée est hydrolysée en 5 minutes. Quel sera le temps nécessaire pour hydrolyser la même quantité d'urée en absence d'enzyme ?

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Le site actif

L'efficacité de la catalyse enzymatique est due à la formation d'un complexe **ES** qui précède l'acte catalytique : $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Le site actif, suite...

1. Le site actif est de petite taille relativement au volume de la protéine

2. Le site actif est tridimensionnel : les résidus aminoacyles et les cofacteurs qui le composent sont disposés d'une manière très précise les uns par rapport aux autres et par rapport à la structure du substrat. Cette structure spatiale est une des conséquences de la structure tertiaire de la protéine

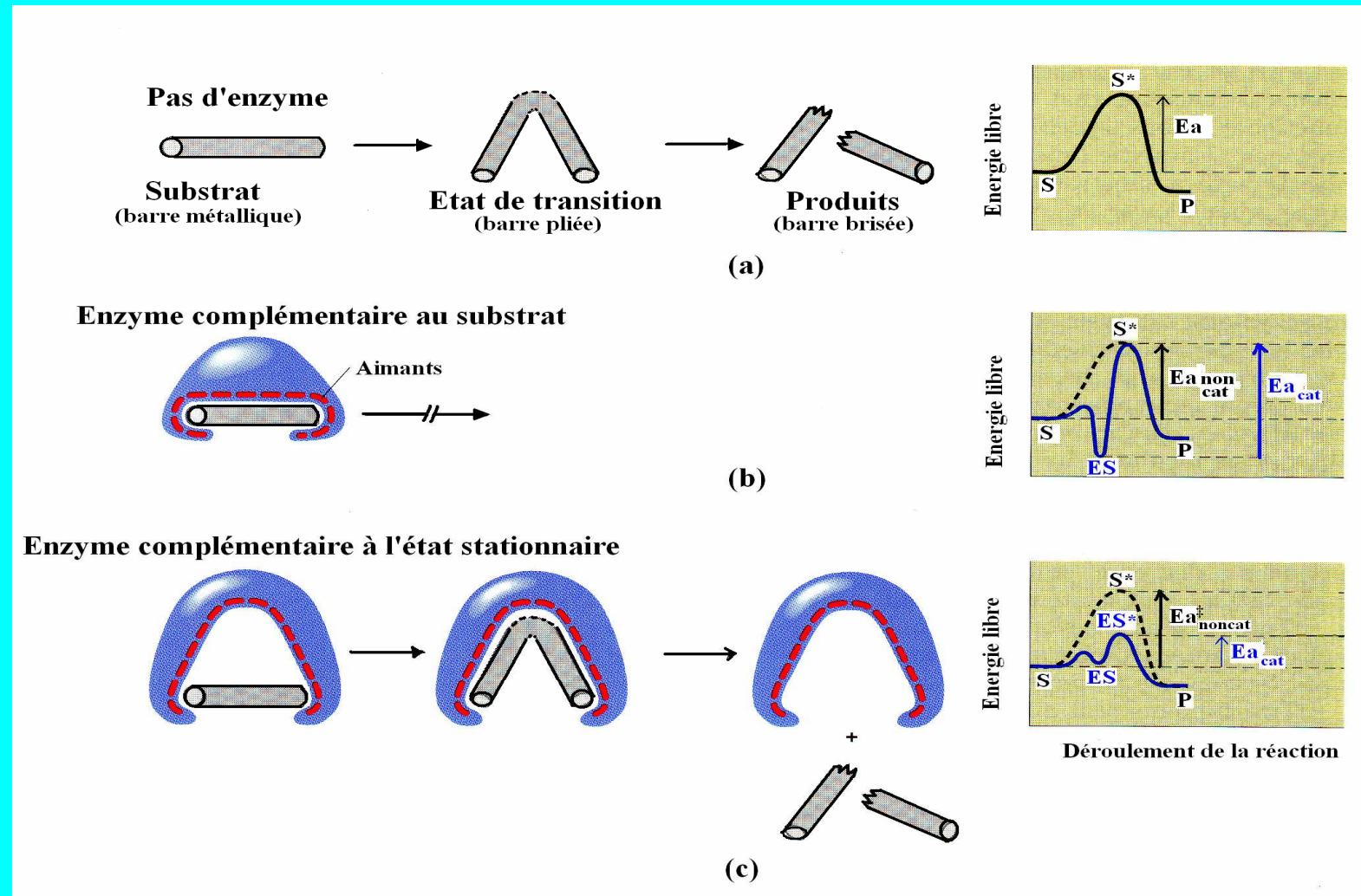
III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

• Le site actif, suite...

3. Dans la majorité des cas les interactions initiales entre l'enzyme et les molécules du substrat qui mènent à la formation du complexe ES sont non covalentes
4. Les sites actifs se trouvent dans les crevasses et les fissures de la structure tertiaire de la protéine. L'effet d'une telle structure est de fixer le substrat dans un environnement hydrophobe. Ceci est de nature à diminuer l'agitation brownienne des molécules du substrat et à augmenter considérablement la concentration du substrat dans la région du site actif

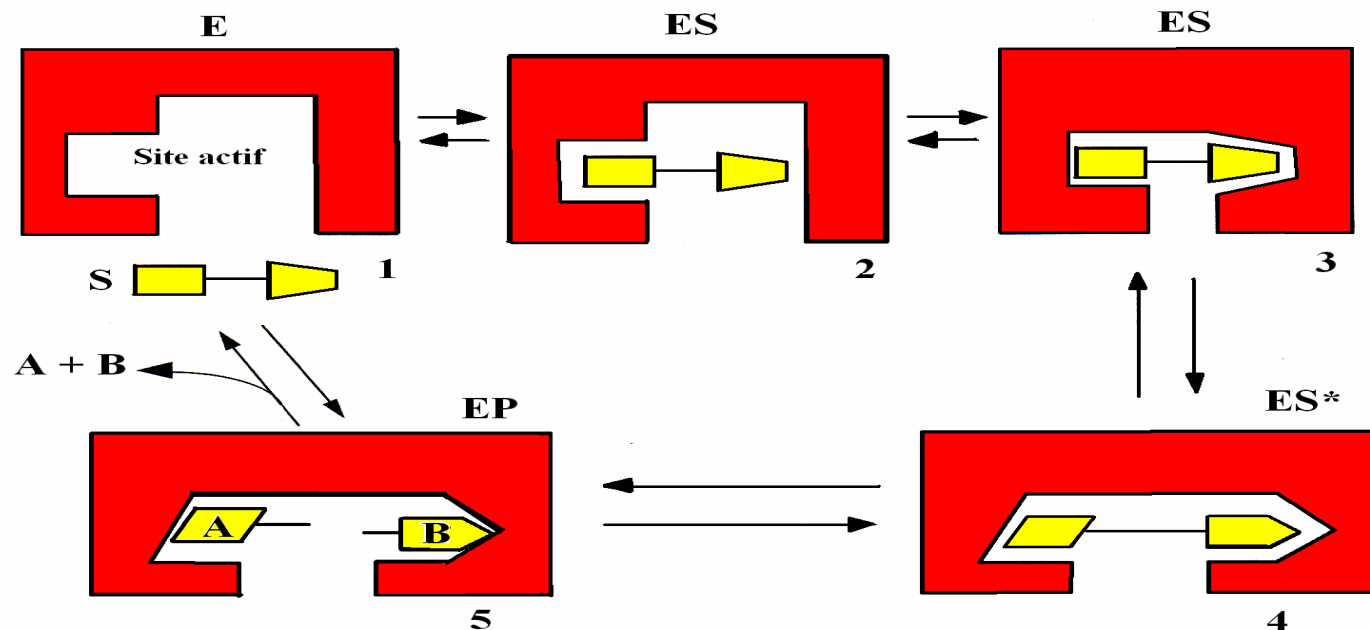
III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

• Modèles du site actif



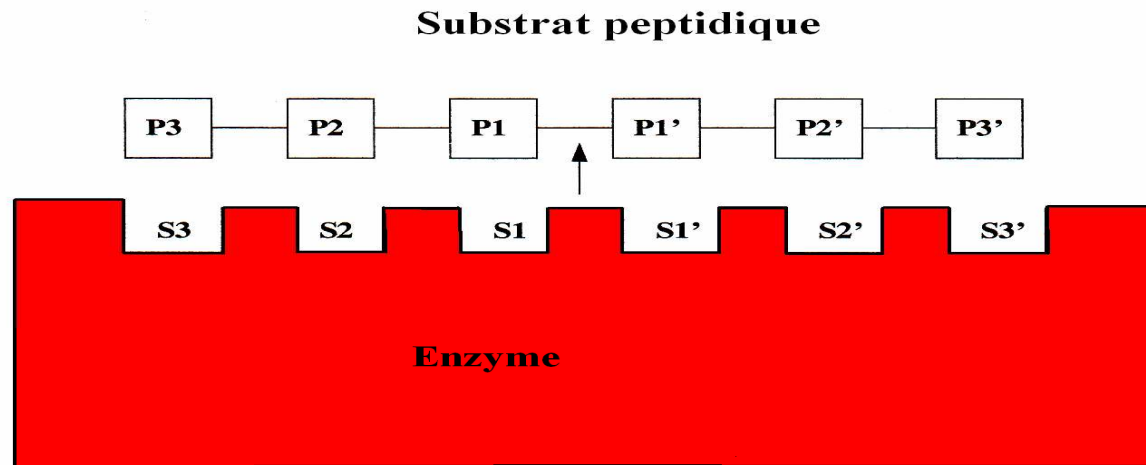
III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Modèles du site actif**



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

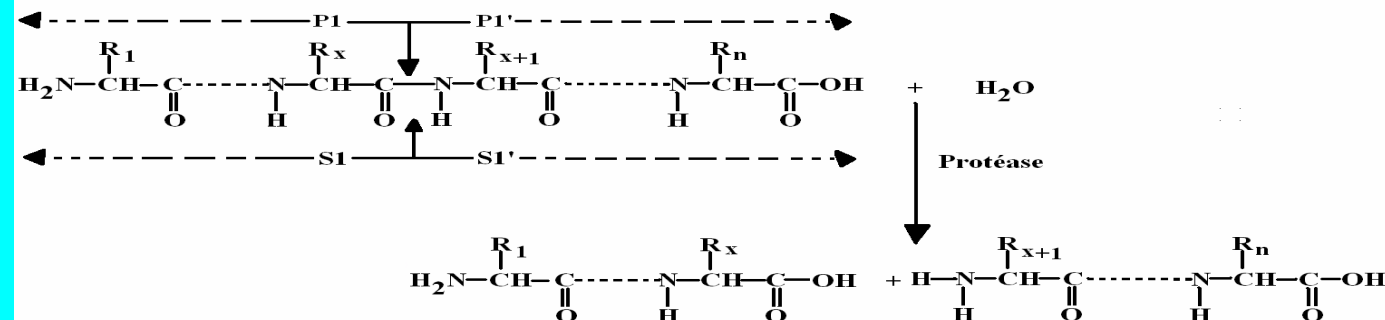
- Les acides aminés du site actif**



Nomenclature du site actif des protéases selon Schechter et Berger (1967)

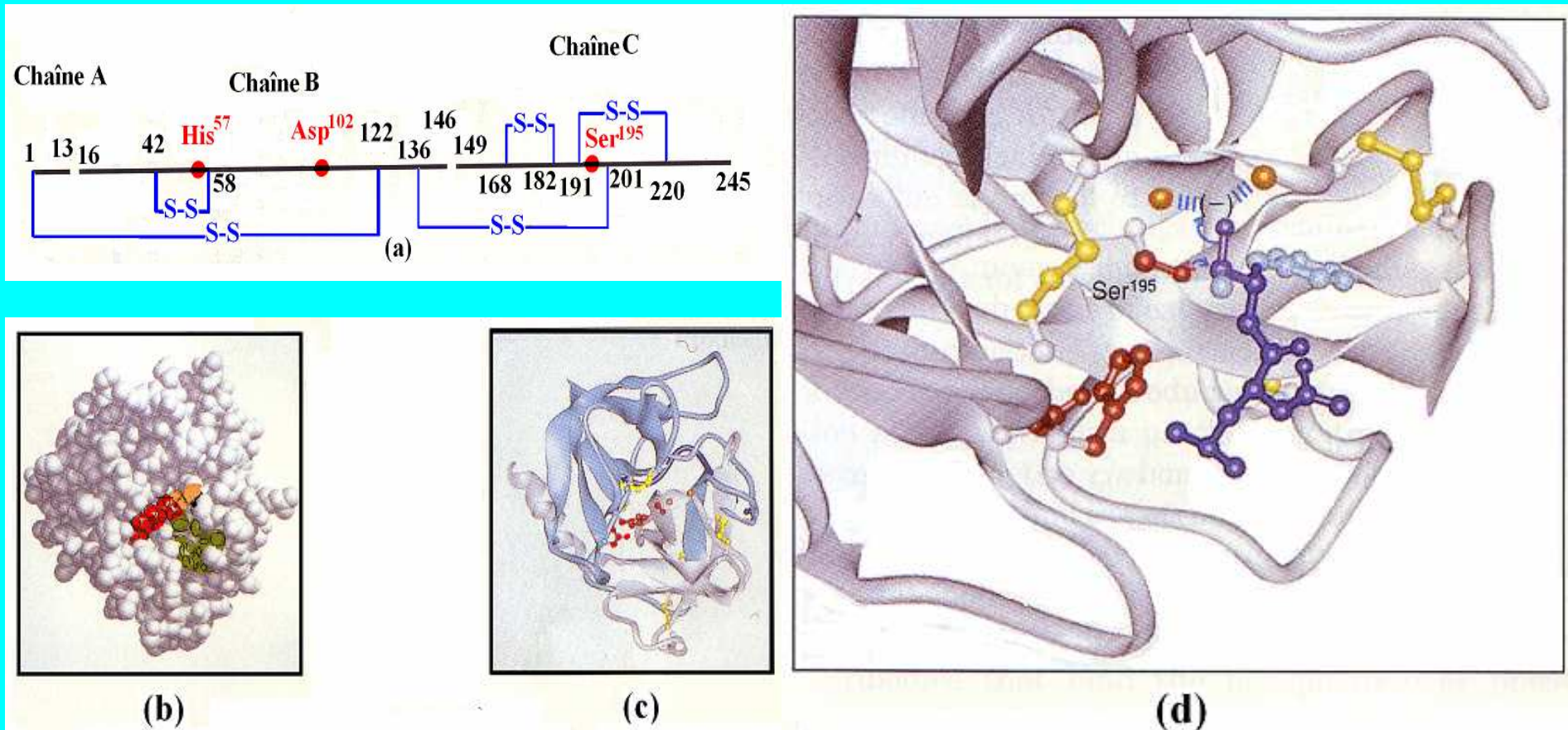
Les résidus aminoacyles P1-Pn du substrat peptidique sont du côté N-terminal, et P1'-Pn' du côté C-terminal de la liaison peptidique située entre P1 et P'1 et qui est le site de l'attaque catalytique.

Les résidus correspondant du site actif sont S1-Sn et S1'-Sn'

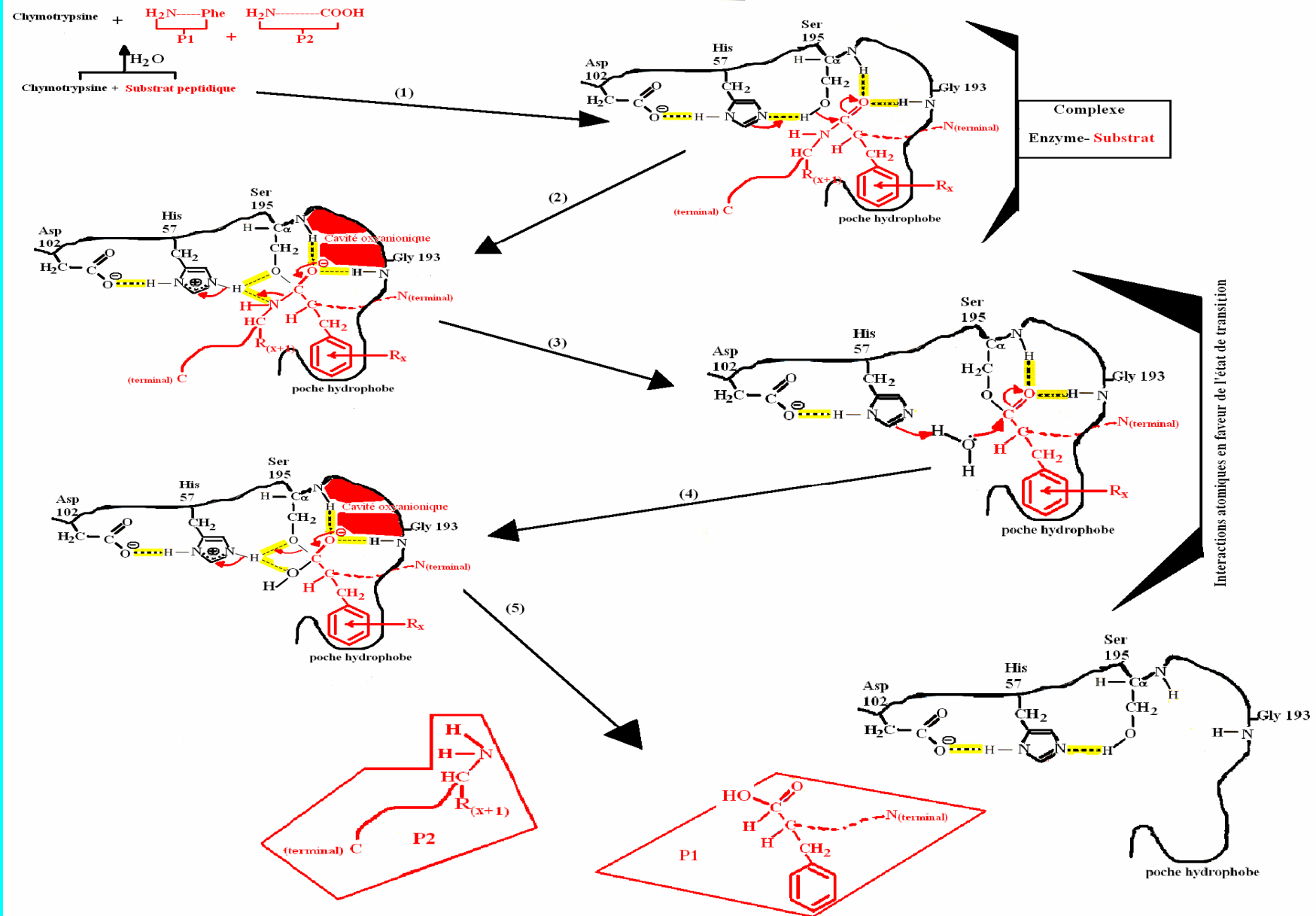


III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Les acides aminés du site actif**



• Les acides aminés du site actif



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Les acides aminés du site actif : **exercice d'application**

Certains résidus aminoacyles de la séquence polypeptidique d'un enzyme échafaudent dans la structure tridimensionnelle de la protéine une sorte de poche qui constitue le site actif. Ces aminoacyles sont nécessaires pour lier le substrat et catalyser les transformations chimiques de la réaction. La carboxypeptidase, une chaîne polypeptidique unique de 307 résidus aminoacyles, est une exoprotéase : elle catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques d'un substrat protéique par élimination séquentielle des résidus aminoacyles en position C-terminale. Les résidus Arg¹⁴⁵ et Glu²⁷⁰ sont essentiels pour l'activité catalytique de cet enzyme.

a) Si la carboxypeptidase était une hélice α parfaite, quelle serait la distance en nm entre les deux sites catalytiques→

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Les acides aminés du site actif : **exercice d'application**

b) Expliquer comment ces deux résidus si éloignés dans la séquence pourront-ils catalyser la transformation d'une liaison de quelques dixièmes de nanomètres

c) Si ces deux résidus sont seuls impliqués dans l'activité catalytique pourquoi est-il nécessaire que l'enzyme contienne un si grand nombre de résidus aminoacyles ?

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Spécificité du site actif: LE SUBSTRAT**

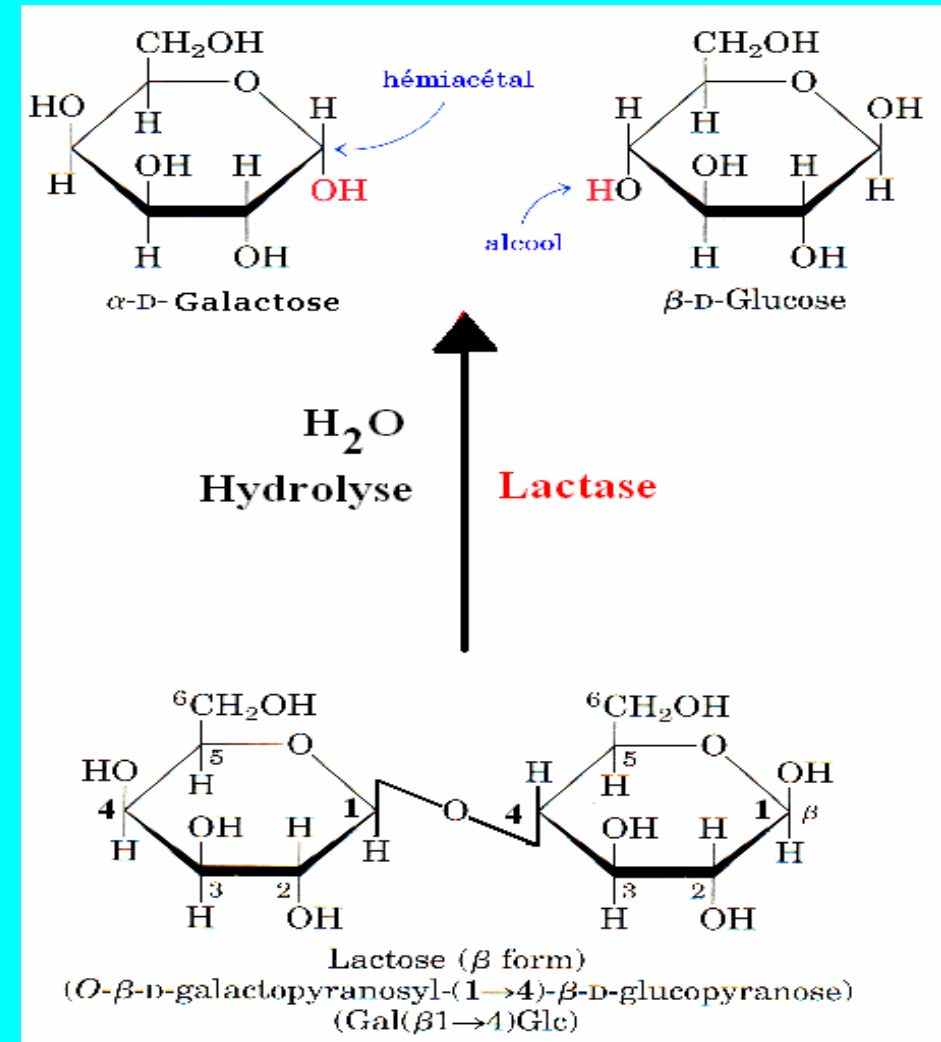
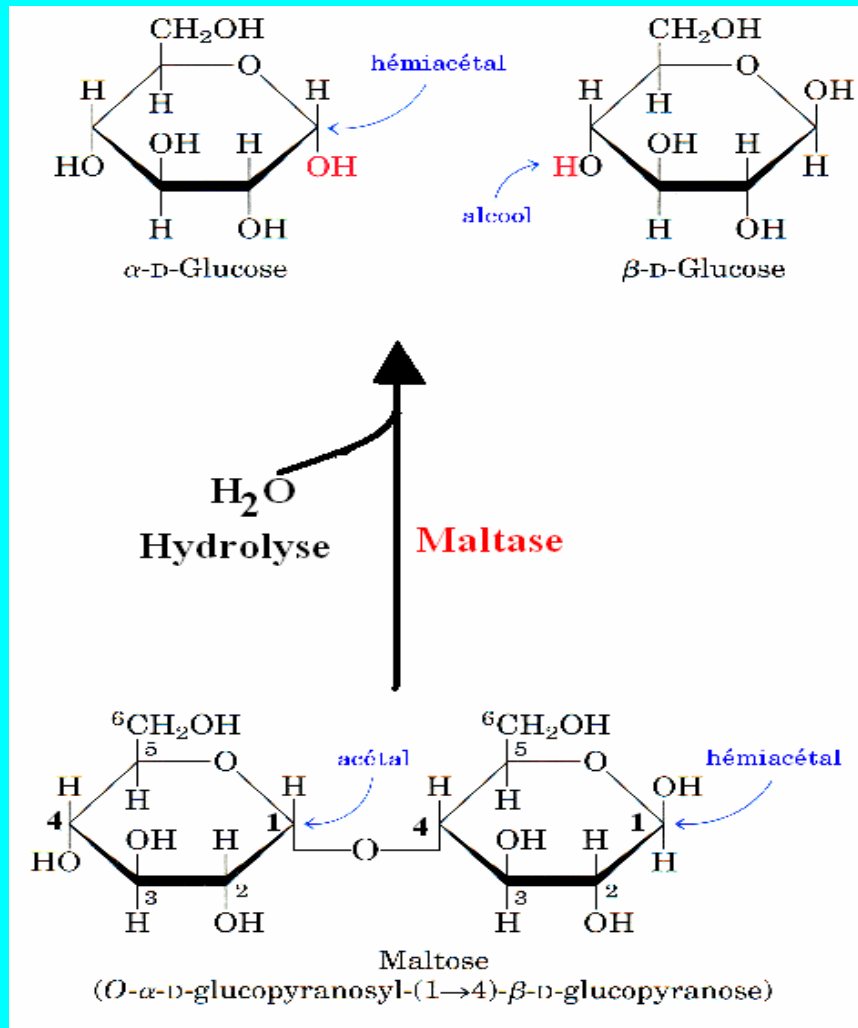
Trois exemples de protéase qui couvrent un large spectre de spécificités

Enzymes	Substrat*	Spécificité
Subtilisine	Plusieurs liaisons peptidiques	Faible
Trypsine	Lys—X...etArg—X..., où X est ≠ de Pro	Modérée
Thrombine	Arg—Gly....	Stricte

*** Par référence à la liaison peptidique dans les protéines reconnue et hydrolysée par l'enzyme**

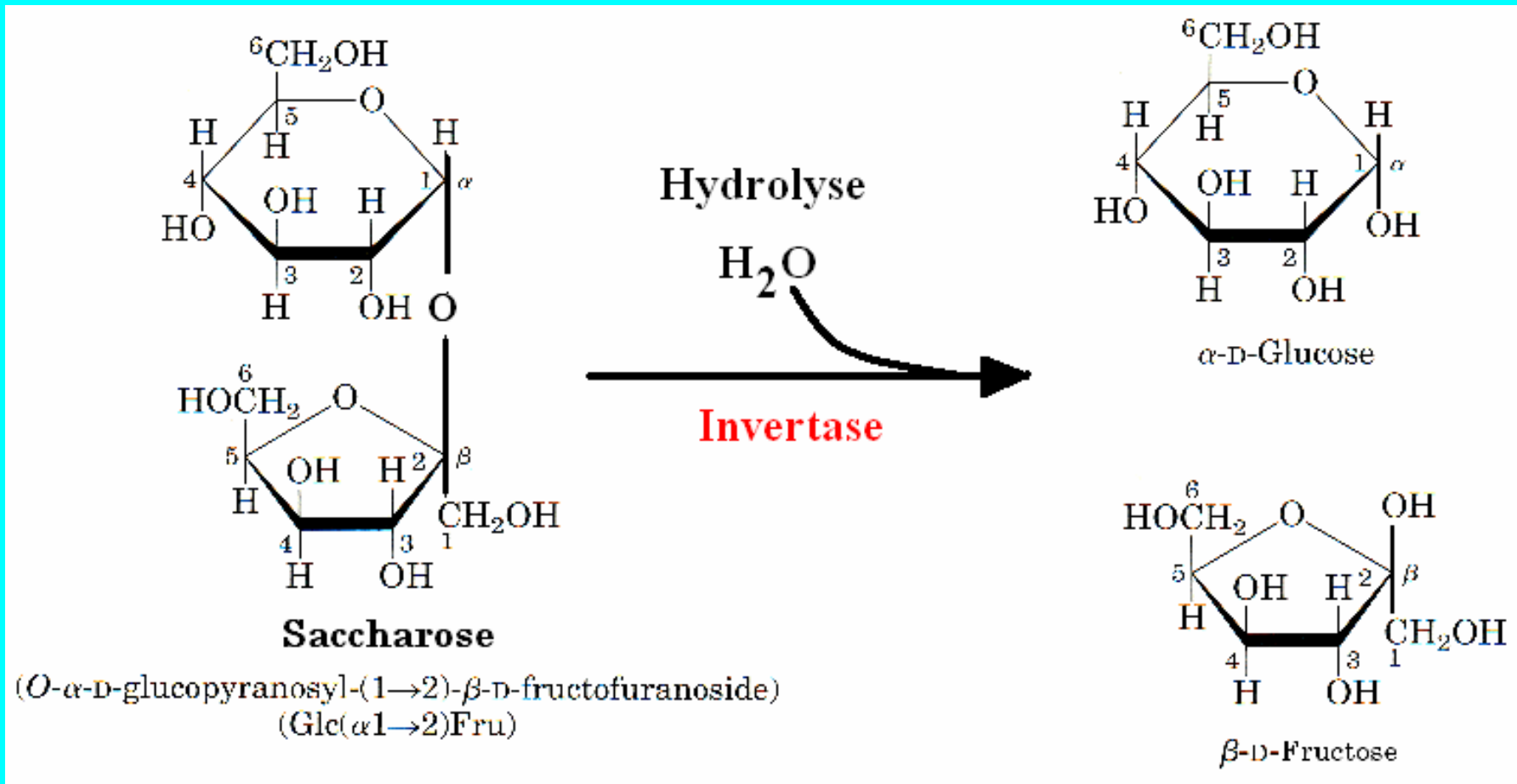
III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

• Spécificité du site actif



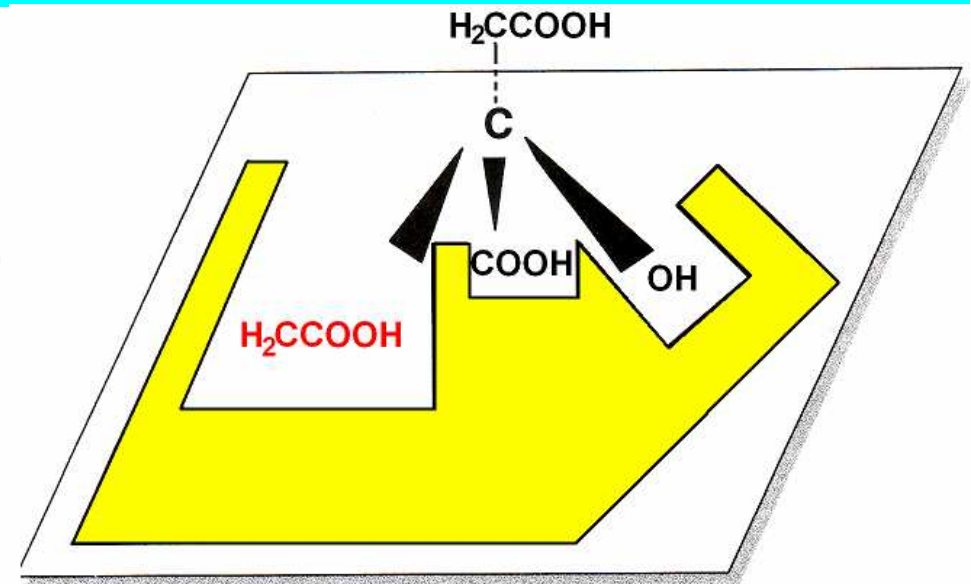
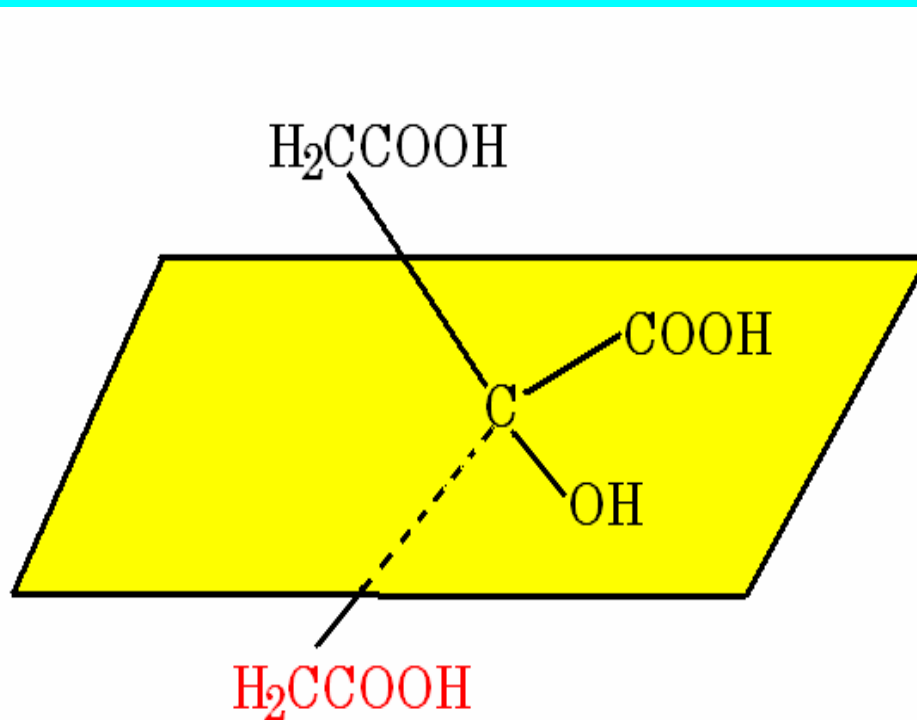
III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Spécificité du site actif



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Spécificité du site actif



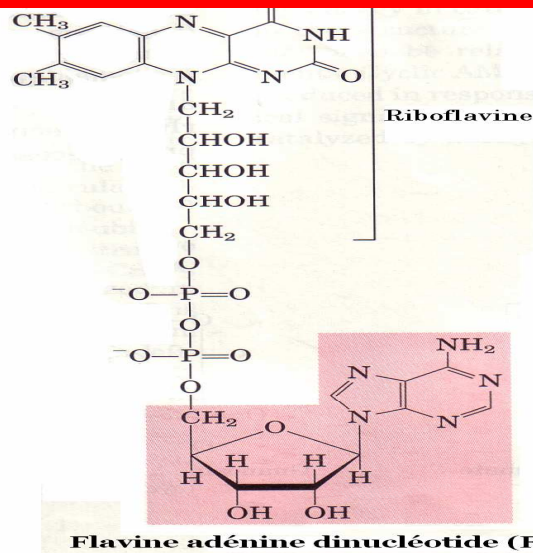
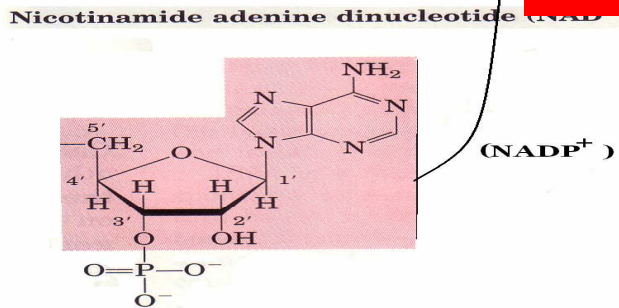
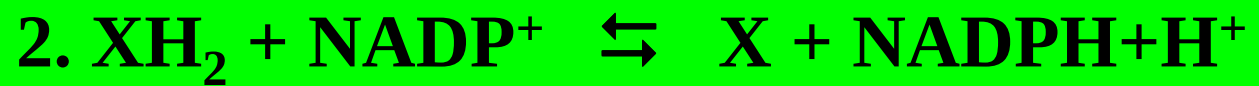
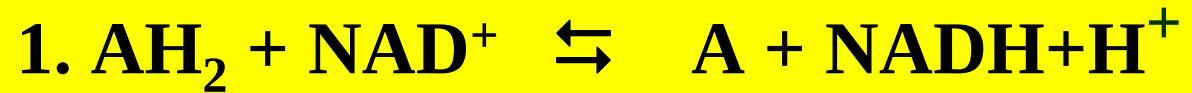
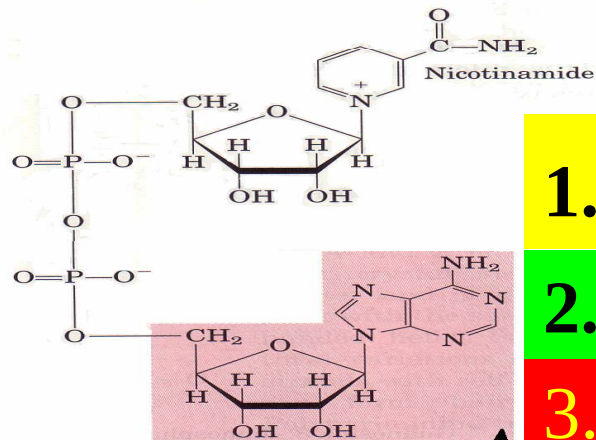
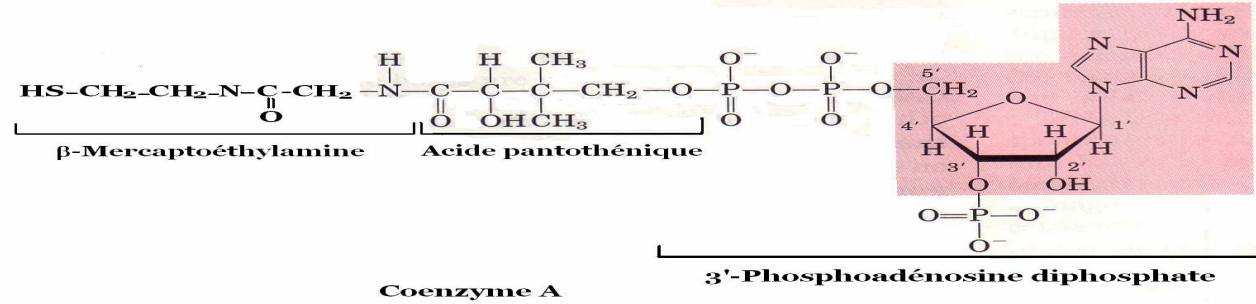
Règle des trois points d'attachement
d'Alexander G. OGSTON (1948)

III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Spécificité du site actif : le cofacteur

Quelques enzymes nécessitant des cofacteurs métalliques

Fe^{2/3+}	Cytochrome oxydase. Catalase. Péroxydase.	Mg²⁺	Héxokinase. Pyruvate kinase G-6-Phosphatase
Cu²⁺	Cytochrome oxydase	Ni²⁺	Uréase
Zn²⁺	Anhydrase carbonique Alcool déshydrogénase	Mo	Dinitrogénase
K⁺	Pyruvate kinase	Se	Glutathion peroxy- dase

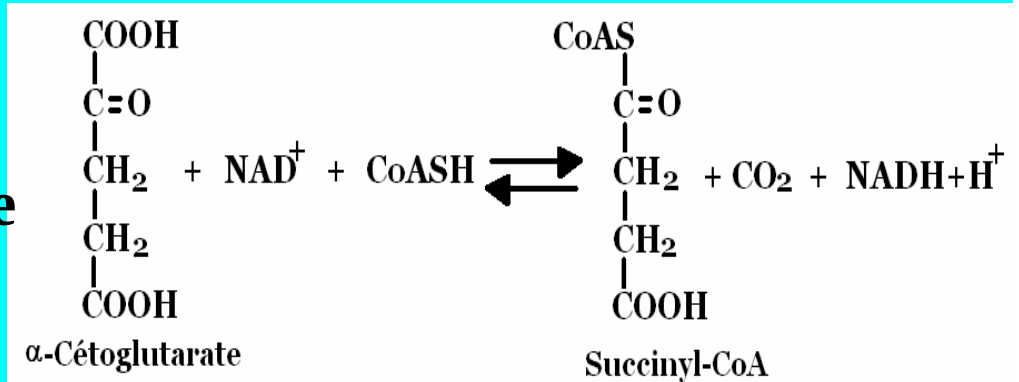


III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

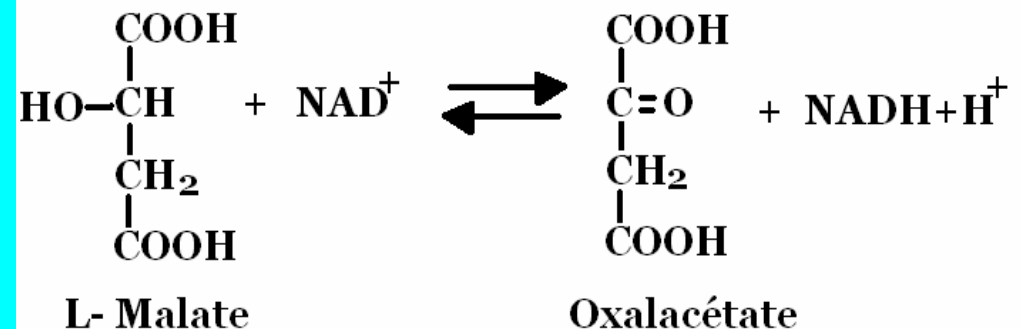
- Spécificité du site actif : le coenzyme

- Enzymes à NAD

α - Cétooglutarate déshydrogénase



L- Malate déshydrogénase

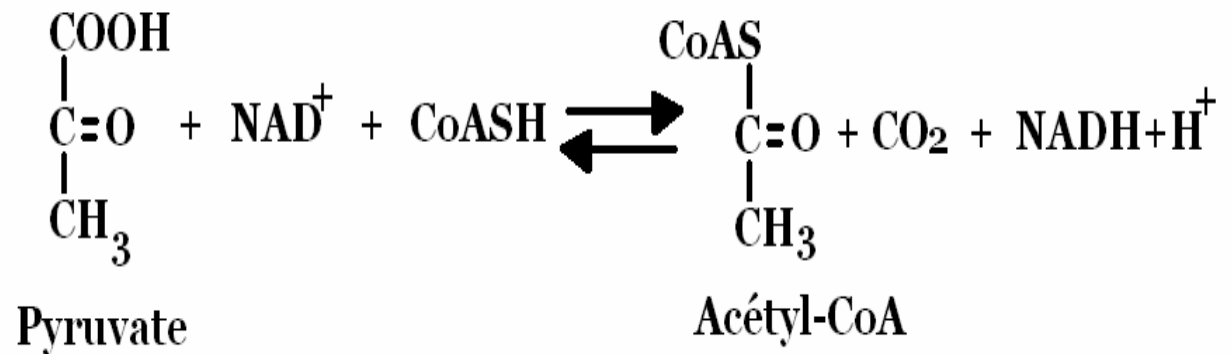


III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

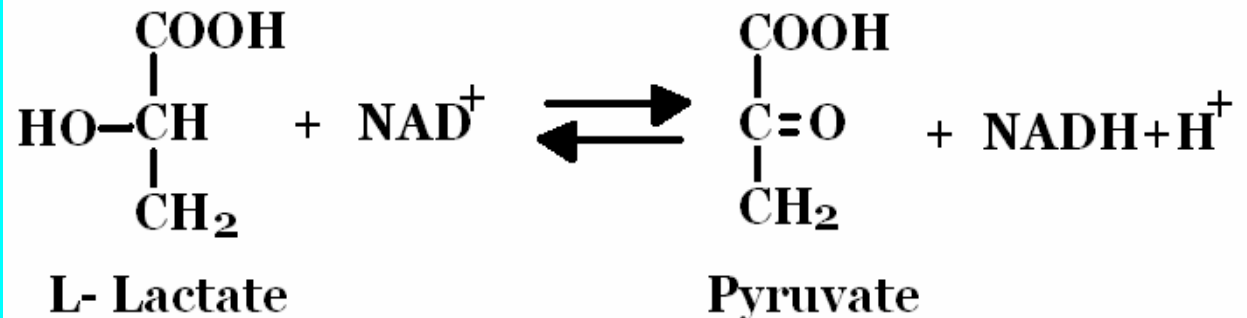
- Spécificité du site actif : le coenzyme

- Enzymes à NAD

**Pyruvate
déshydrogénase**



**L- Lactate
déshydrogénase**

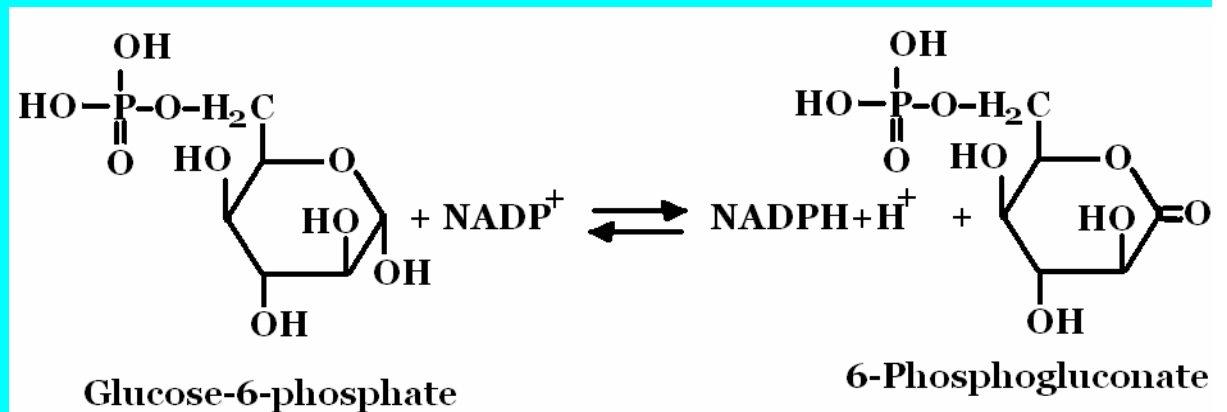


III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

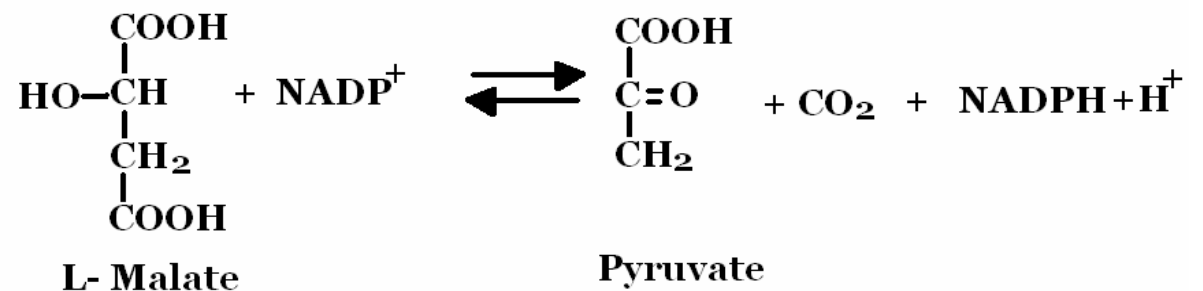
- Spécificité du site actif : le coenzyme

- Enzymes à NADP

**Glucose-6-phosphate
déshydrogénase**



Enzyme malique

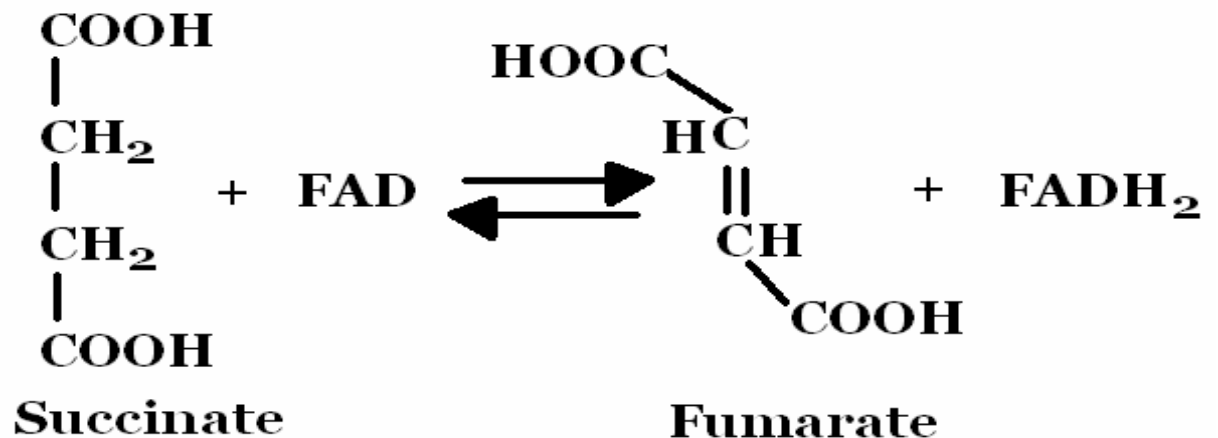


III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

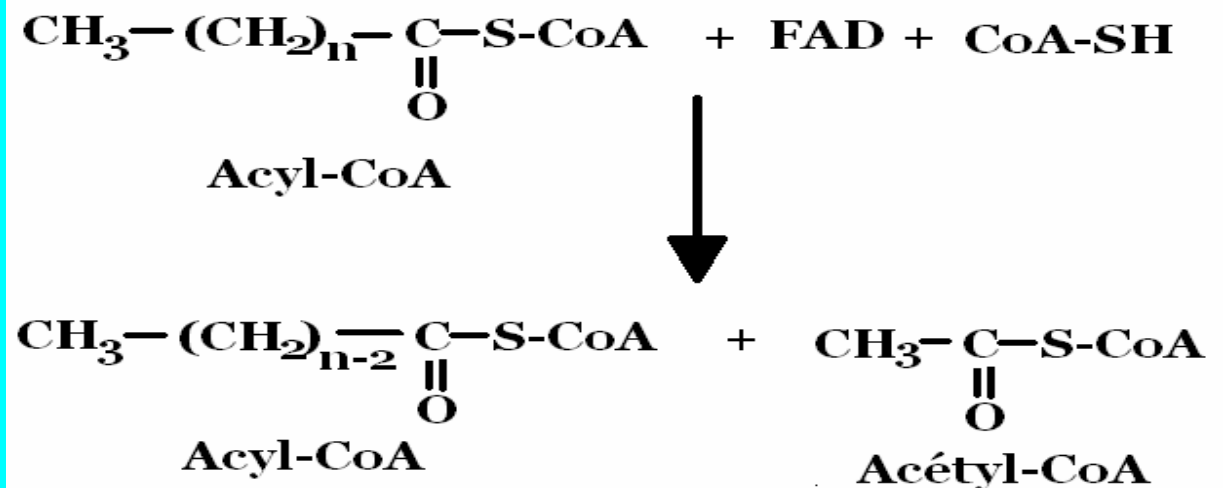
- Spécificité du site actif : le coenzyme

- Enzymes à FAD

Succinate
déshydrogénase

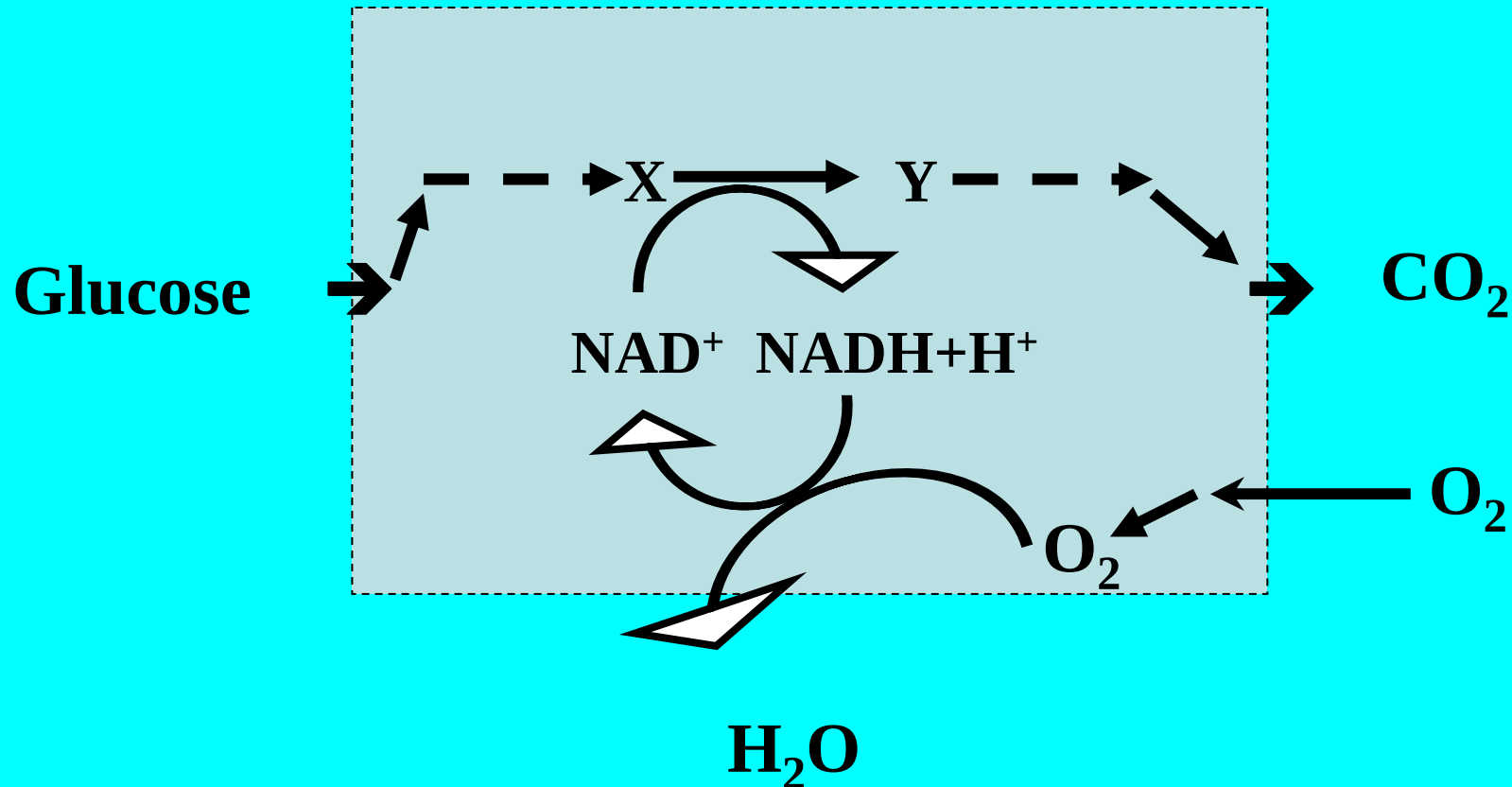


Acyl-CoA
déshydrogénase



III- MÉCANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

- Rôle métabolique des coenzymes



III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Classification et nomenclature des enzymes

N°. Classe. Type de réaction catalysée par l'enzyme

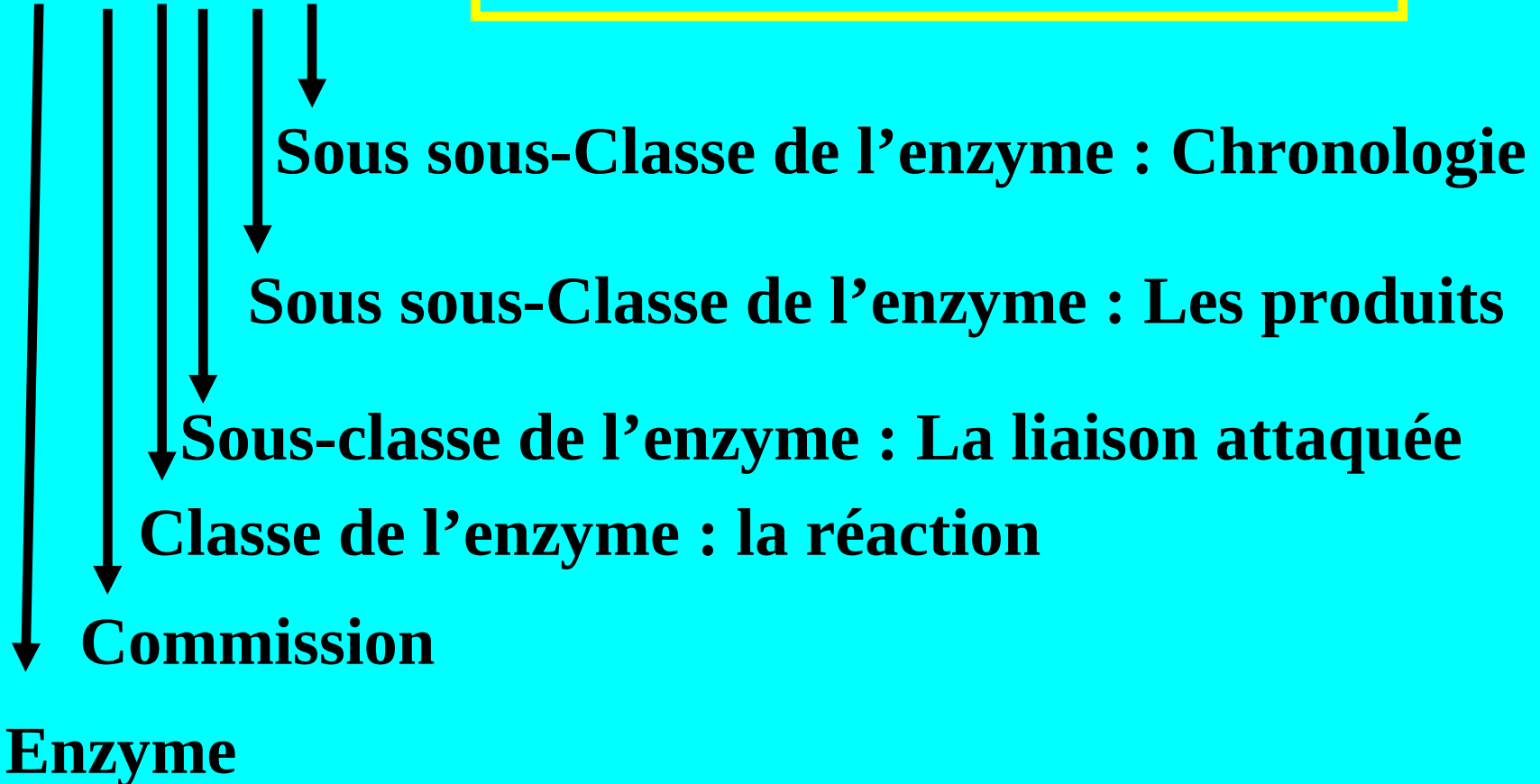
- 1. Oxydoréductases. Transfert d'électrons et d'hydrogène**
- 2. Transférases. Transfert de groupements fonctionnels**
- 3. Hydrolases. Hydrolyse**
- 4. Lyases. Coupures de liaisons et formation des Δ .
Addition de groupements fonctionnels sur des Δ**
- 5. Isomérases. Equilibre entre deux isomères de la même molécule**
- 6. Ligases. Formation de nouvelle liaisons interatomiques en utilisant l'énergie de l'ATP**

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

E.C.a.b.c.d

a, b, c et d sont des chiffres

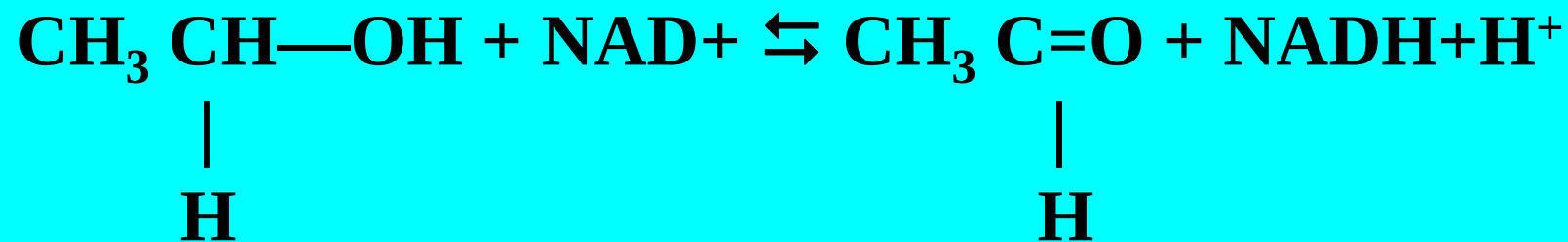


III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Nombre de classification des enzymes**

Exemples

Alcool déshydrogénase : E.C. 1.1.1.1



1. Oxydoréductase

1.1. Agit sur CH—OH

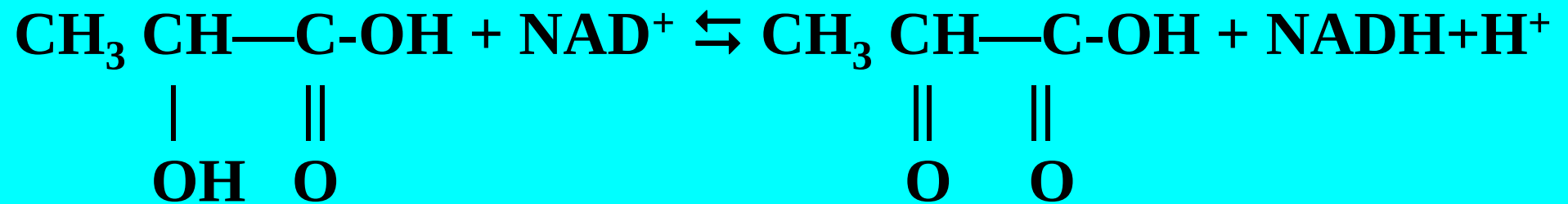
1.1.1. Avec NAD comme accepteur (aussi NADP)

1.1.1.1. Premier enzyme découvert et reconnu

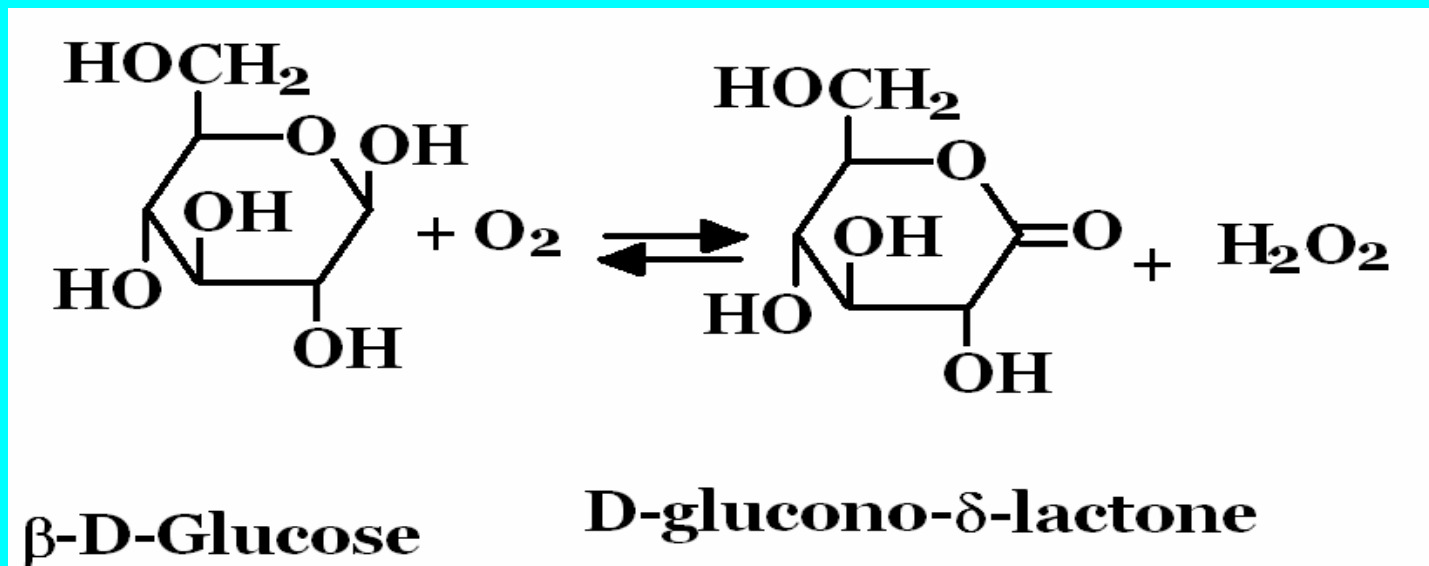
III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

Exemples : Lactate déshydrogénase : E.C. 1.1.1.27



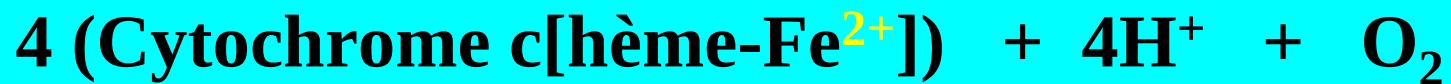
Glucose oxydase : E.C. 1.1.3.4



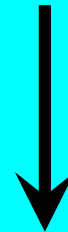
III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

Exemples : Cytochrome oxydase : E.C. 1.9.3.1



Forme réduite



Forme Oxydée

Ajouter le sens de E.C.1.9.3.1



Agissant sur les groupements hémiques comme donneur d'électrons

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Nombre de classification des enzymes**

Exemples : Transférases : E.C.2.

1. Un groupement monocarboné E.C.2.1.

- . **–CH₃ E.C.2.1.1.**
- . **–CH₂OH E.C.2.1.2.**
- . **–COOH E.C.2.1.3.**

2. Aldéhydes et cétones E.C.2.2.

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Nombre de classification des enzymes**

Exemples : Transférases : E.C.2.

6. Les groupements aminés E.C.2.6.

Aspartate aminotransférase E.C.2.6.1.1

L-Aspartate + α -CG $\rightleftharpoons$ L-Glutamate + OAA

Alanine aminotransférase E.C.2.6.1.2

L-Alanine + α -CG $\rightleftharpoons$ L-Glutamate + Pyruvate

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

Exemples : Transférases : E.C.2.

7. Les groupements Phosporylés E.C.2.7.

-1 ; Le groupement alcool comme accepteur.

Glucokinase E.C. 2.7.1.2

$\text{ATP} + \text{D-glucose} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{D-glucose-6-phosphate}$

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Nombre de classification des enzymes**

Exemples : Hydrolases : E.C.3.

1. Agissant sur les liaisons esters E.C.3.1.

-1 ; Esters carboxyliques

Acétylcholinestérase E.C.3.1.1.7

Acétylcholine + H₂O $\rightleftharpoons$ Choline + Acide acétique

-3 ; Esters phosphoriques

Glucose-6-phosphatase E.C.3.1.3.9

D-Glucose-6-phosphate + H₂O $\rightleftharpoons$ D-Glucose + H₃PO₄

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- **Nombre de classification des enzymes**

Exemples : Lyases : E.C.4.

1. Agissant sur les liaisons carbone-carbone E.C.4.1.

-1 ; Carboxy-lyase

Aspartate-4- décarboxylase E.C.4.1.1.12

L-Aspartate $\rightleftharpoons$ L-Alanine + CO₂

2. Agissant sur les liaisons carbone-Oxygène E.C.4.2.

Citrate déshydratase E.C.4.2.1.4

Citrate $\rightleftharpoons$ cis-aconitate + H₂O

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

Exemples : Isomérases : E.C.5.

1. Racémases et épimérases E.C.5.1.

-1 ; agissant sur des acides aminés et leurs dérivées

Alanine racémase E.C.5.1.1.1

L-Alanine $\rightleftharpoons$ D-Alanine

-3 ; agissant sur des hydrates de carbone et leurs dérivées

UDPglucose épimérase E.C.5.1.3.2

UDPglucose $\rightleftharpoons$ UDPgalactose

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

Exemples : Ligases : E.C.6.

1. Formant des liaisons C—O E.C.6.1.

-1 ; Les aminoacyl-ARN ligases

Tyrosyl-ARNt synthétase E.C.6.1.1.1

ATP + L-tyrosine + ARNt



AMP + PPi + L-tyrosyl-ARNt

III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nombre de classification des enzymes

Exemples : Ligases : E.C.6.

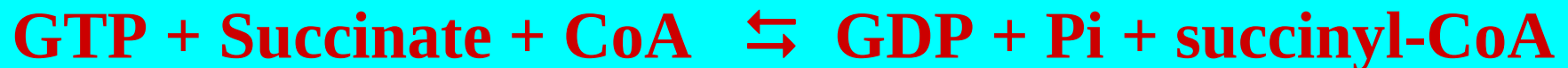
1. Formant des liaisons C—S E.C.6.2.

-1 ; Les Acide-thiols ligases

Acétyl-CoA synthétase E.C.6.2.1.1



Succinyl-CoA synthétase E.C.6.2.1.4



III- CATALYSE ENZYMATIQUE

- Nomenclature des enzymes

Nom systématique

Nom ordinaire

L-Lactate : NAD oxydoréductase

Lactate déshydrogénase

ATP : glucose-6-phosphotransférase

Glucokinase

Acétate : CoA ligase (AMP)

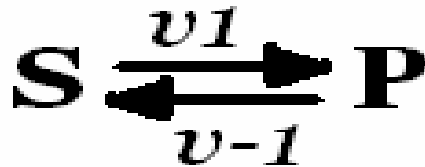
Acétyl-CoA synthétase

Succinate : CoA ligase (GDP)

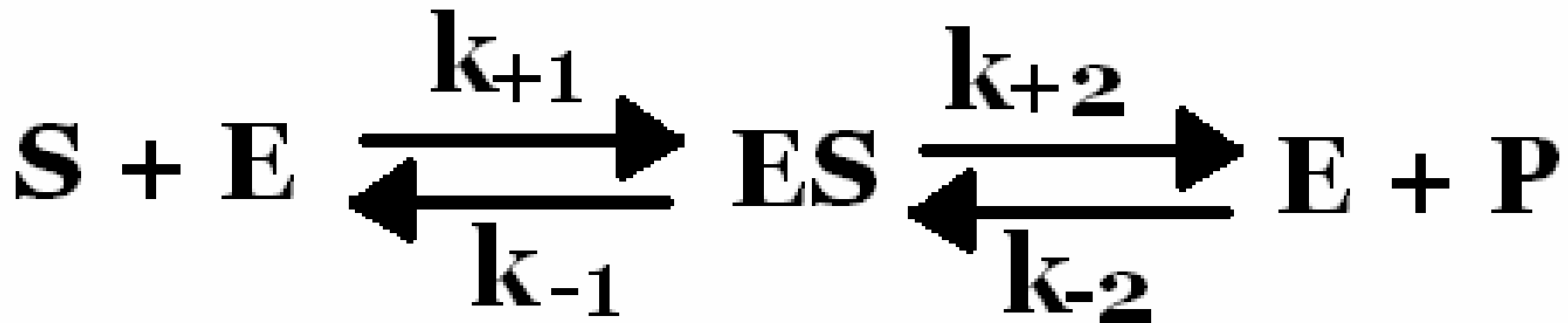
Succinyl-CoA synthétase

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Les conditions initiales

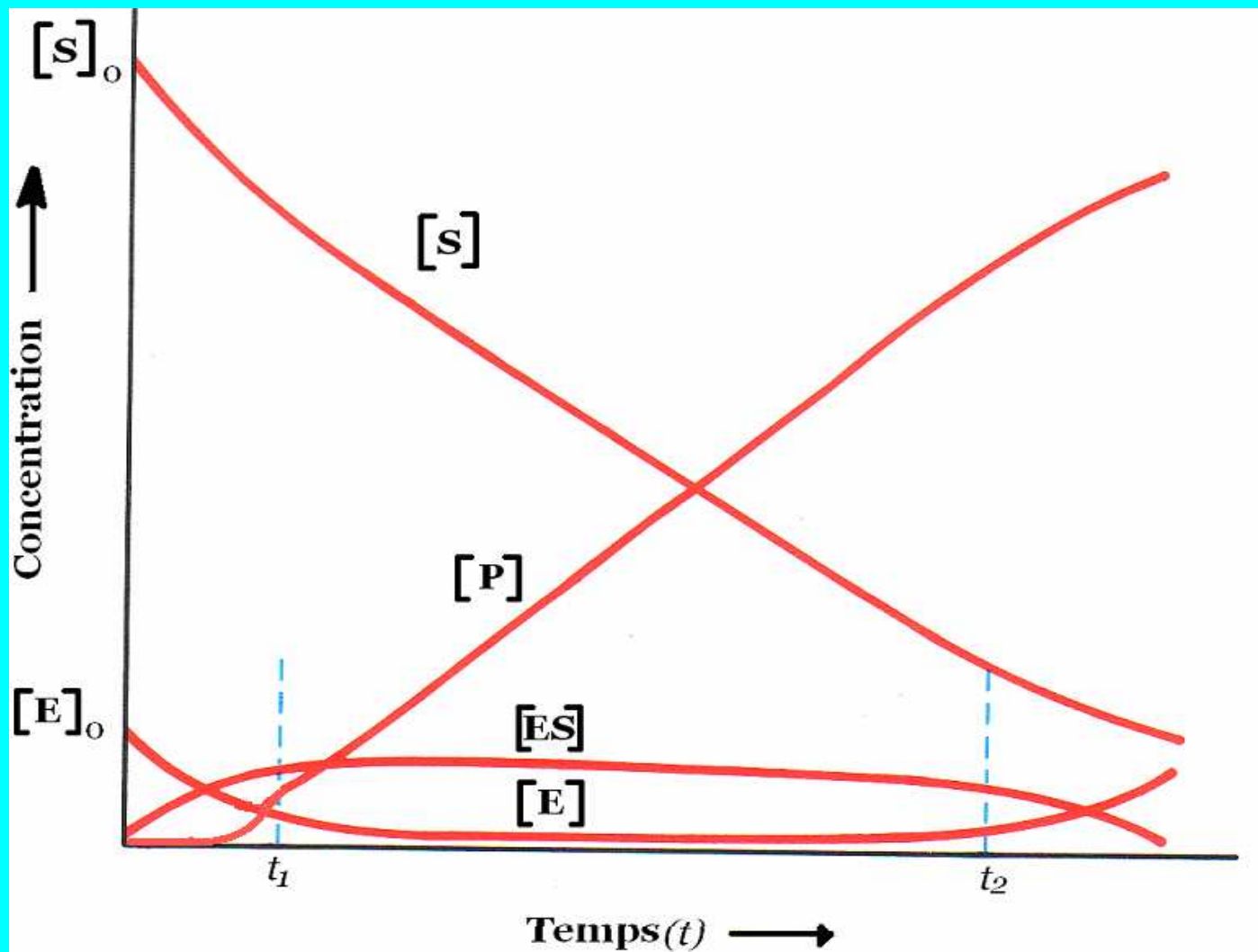


$$v = v_1 - v_{-1}$$



CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Les conditions initiales



CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Les conditions initiales

Trois phases :

1) **Une phase pré stationnaire ; $0 \rightarrow t_1$.** Formation du complexe ES. Etant donné le rapport $[S]/[E] (> 10^3)$, on peut considérer $[S]_{t_1} = [S]_0$ et que la concentration du produit est encore nulle, $[P] = 0$

2) **Une phase stationnaire ; $t_1 \rightarrow t_2$.** La formation du complexe ES atteint son état d'équilibre : c.à.d. La vitesse de sa formation est égale à la vitesse de sa disparition

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Les conditions initiales

Trois phases : suite...

3) **Une phase finale ; t_2** La vitesse apparente de la réaction tend vers zéro. Cette tendance peut être due à plusieurs raisons, principalement :

➤ La vitesse de la réaction inverse commence par compenser celle de la réaction directe et l'ensemble de la réaction tend vers l'équilibre chimique, ou

➤ Le début de l'épuisement du substrat, c'est le cas des réactions totales, ou

➤ L'un des produits de la réaction agit comme un inhibiteur

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Les conditions initiales se résument aux équations suivantes

$$[S] = [S]_0$$

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$



$$v_{initiale} = k_{cat} \times [ES]$$

$$v = k_{cat} \times [ES]$$

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Conclusions.

1. Calculer l'expression de la vitesse à partir des équations d'équilibre que nous venons de détailler

Comparer avec

2. La relation $v = f([S])$, Obtenue expérimentalement

Rappel : pour les cinétiques enzymatiques, on calcule toujours la vitesse de la réaction au temps 0,

$$-\left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$$

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

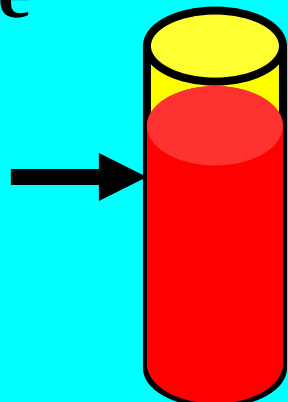
- Calcul de la vitesse : Modèle de Michaelis-Menten

$$v = k_{\text{cat}} \times [\text{ES}]$$

A quoi égal $[\text{ES}]$ dans les conditions initiales ?

Expérience

Tampon



Substrat ; $[\text{S}]_0$

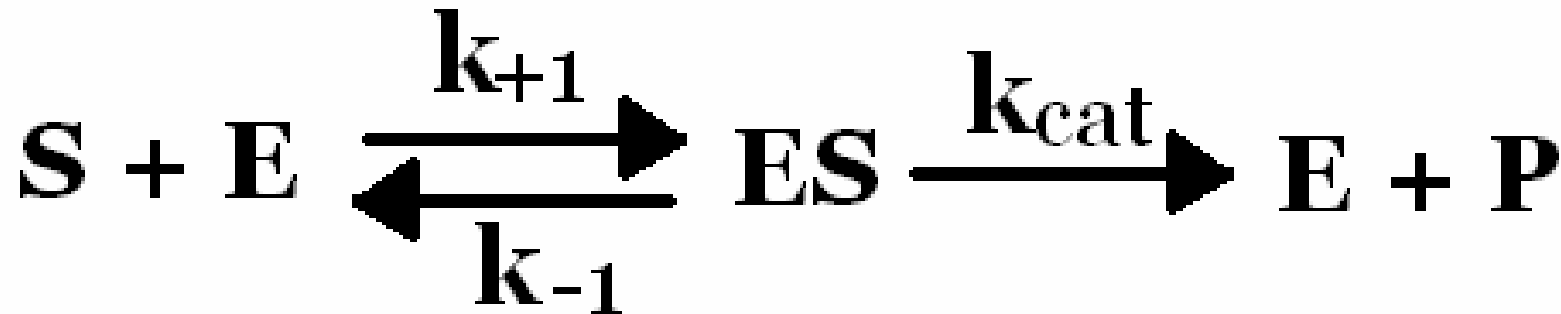
Enzyme; $[\text{E}]_0$

$$[\text{S}]_t = [\text{S}]_0$$

$$[\text{E}]_t = [\text{E}]_0 - [\text{ES}]$$

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Calcul de la vitesse : Modèle de Michaelis-Menten



$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

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

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

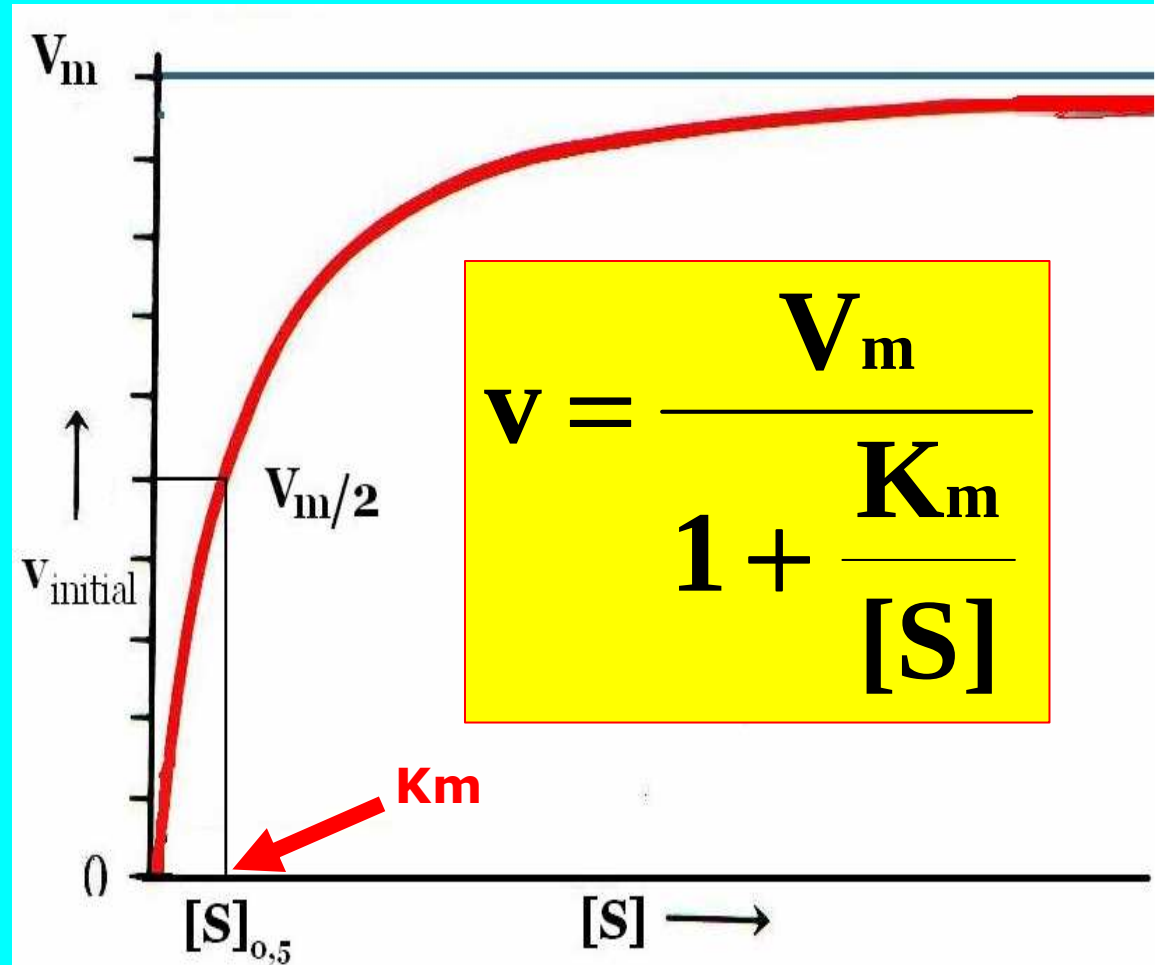
- Calcul de la vitesse : Modèle de Michaelis-Menten

$$v = \frac{k_{cat} [E]_0}{1 + \left(\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}} \right) \cdot \frac{1}{[S]}}$$

$$V_m = k_{cat} \cdot [E]_0$$

$$[S]_{0,5} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}}$$

C'est K_m

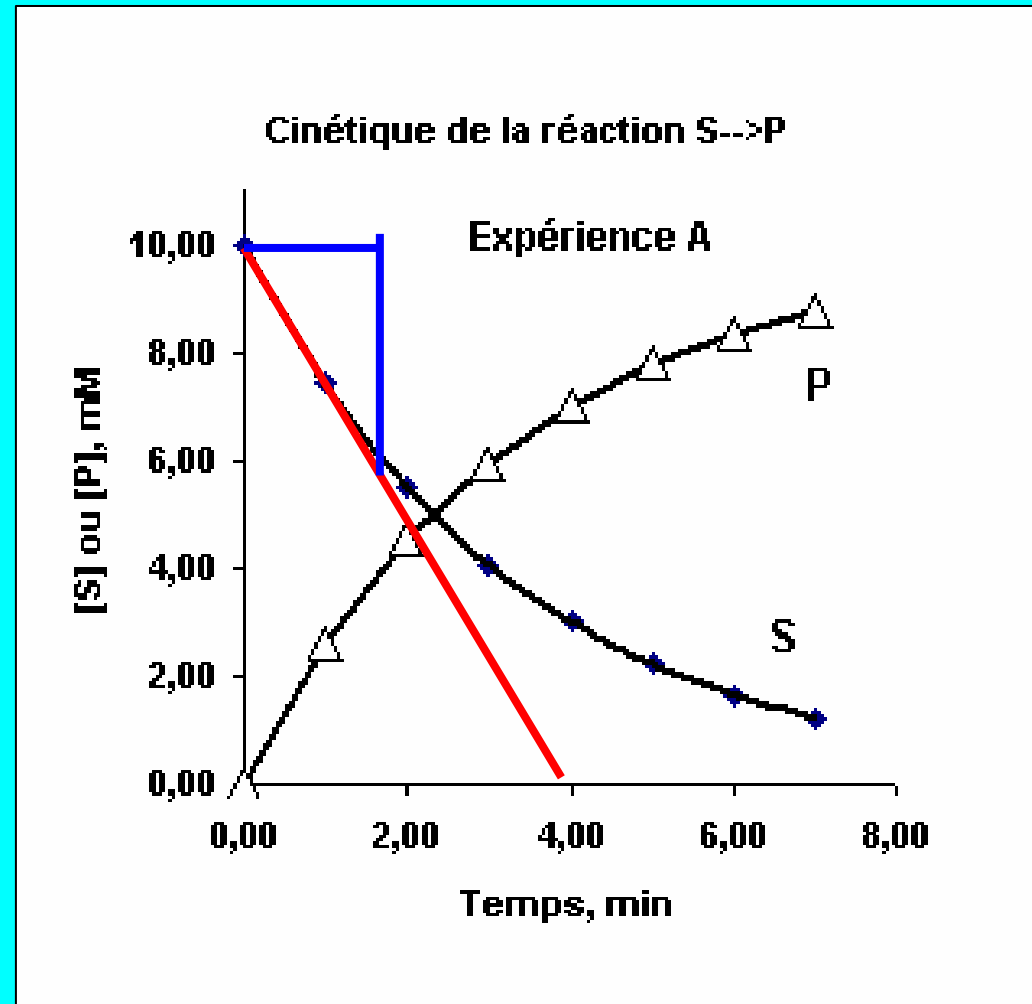


CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

- Relation expérimentale $v = f([S])$

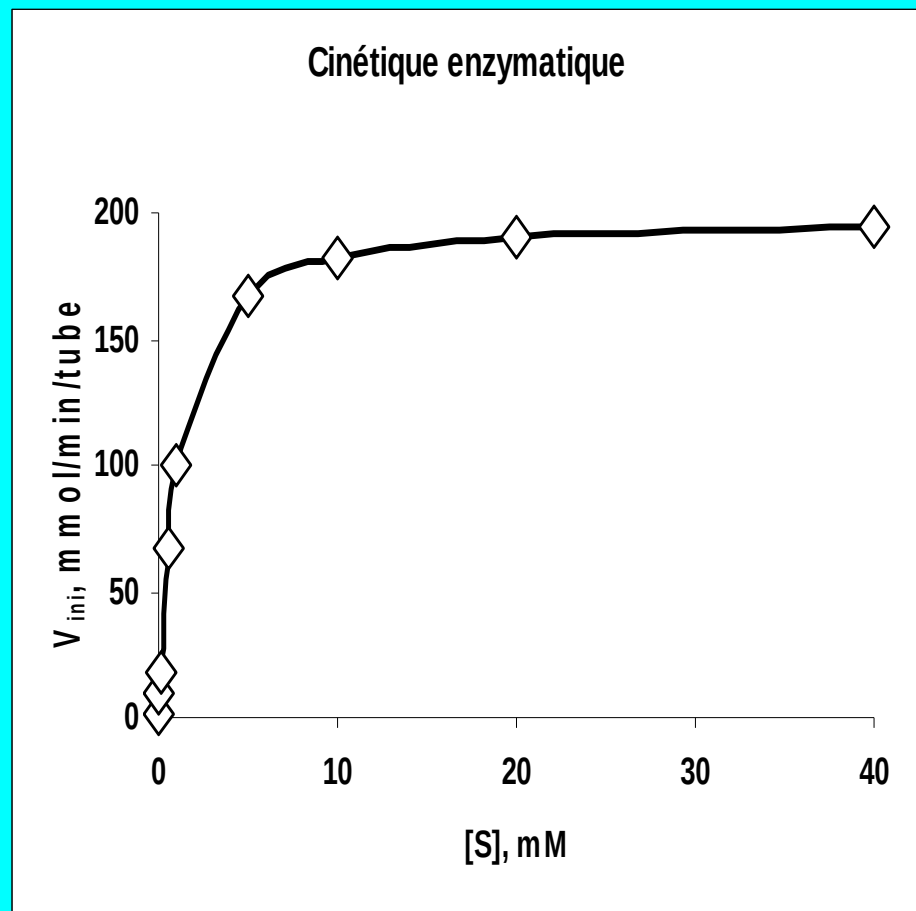
Résultats pour $[S]_1$

T, min	[S] / [P]
t0	C0
t1	C1
t2	C2
t3	C3
t4	C4
t5	C5
t6	C6
t7	C7



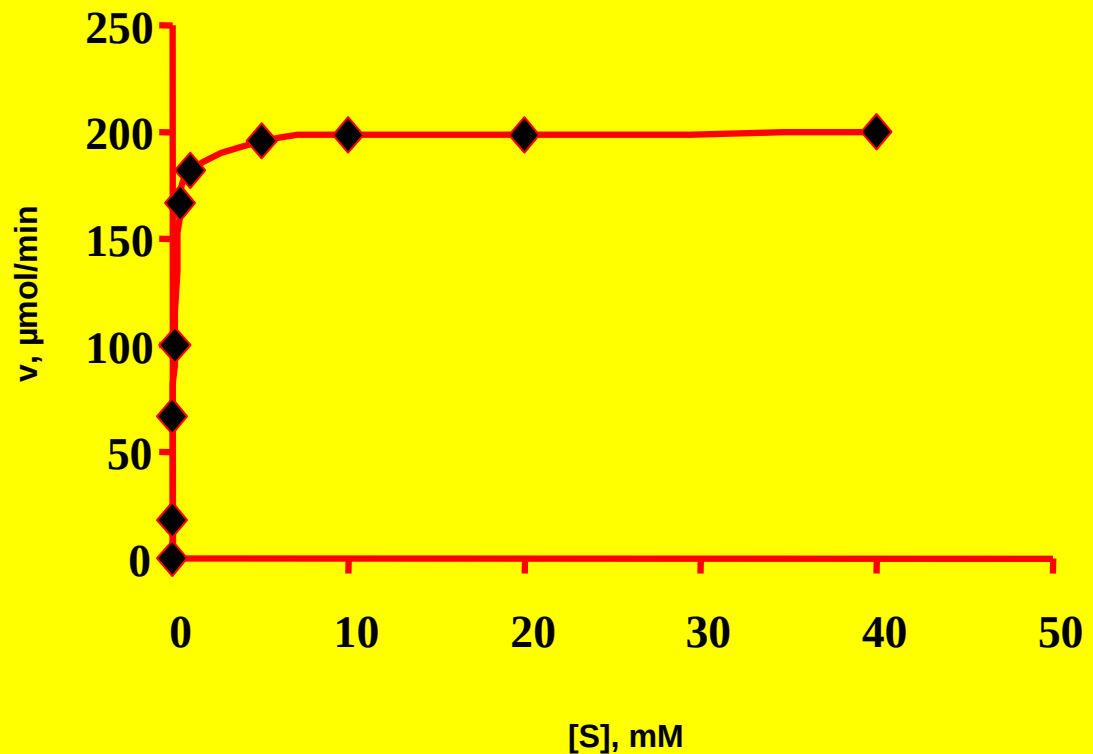
LE GRAPHIQUE V_{INITIALE} EN FONCTION DE $[S]$

$[S]$, mM	v , $\mu\text{mol}/\text{min}$
00,01	01,98
00,05	09,52
00,10	18,18
00,50	66,67
01,00	100,00
05,00	166,67
10,00	181,82
20,00	190,48
40,00	195,12



Calcul de V_m et de K_m

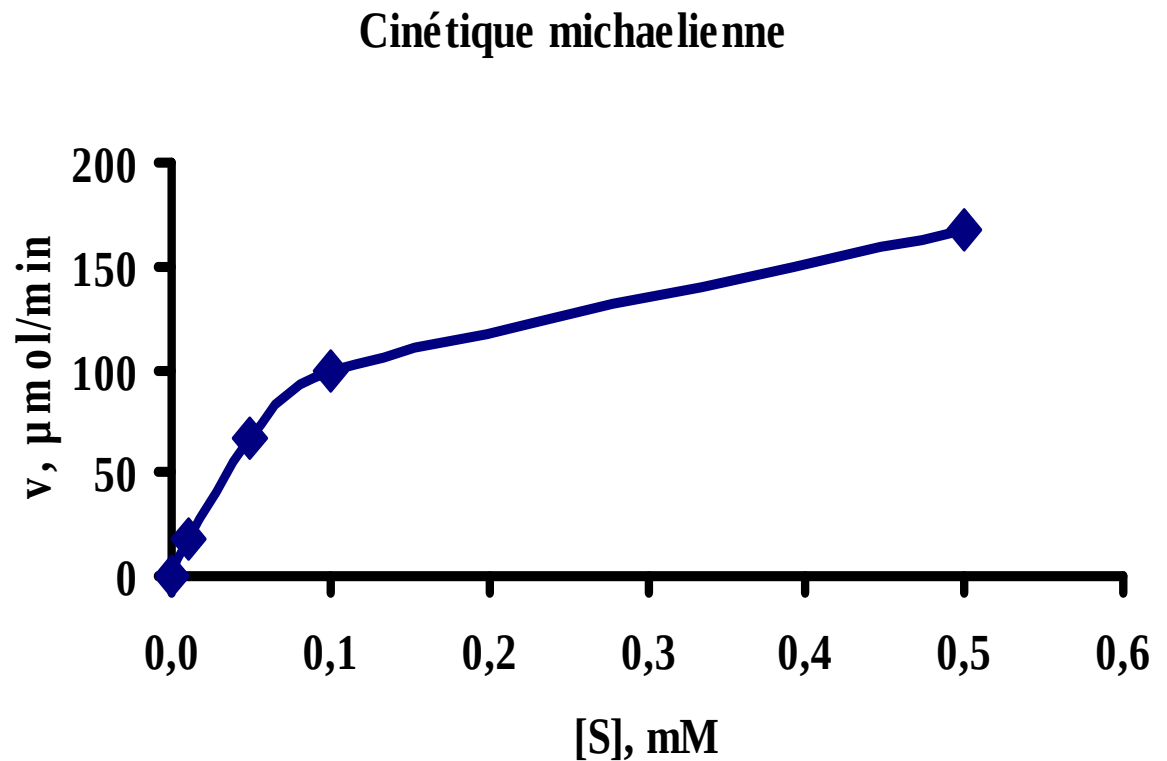
[S], mM	v, $\mu\text{mol/min}$
0,000	0,000
0,010	18,182
0,050	66,667
0,100	100,000
0,500	166,667
1,000	181,818
5,000	196,078
10,000	198,020
20,000	199,005
40,000	199,501



Calcul de V_m et de K_m

Représentation graphique directe

[S], mM	v, $\mu\text{mol/min}$
0,000	0,000
0,010	18,182
0,050	66,667
0,100	100,000
0,500	166,667
1,000	181,818
5,000	196,078
10,000	198,020
20,000	199,005
40,000	199,501

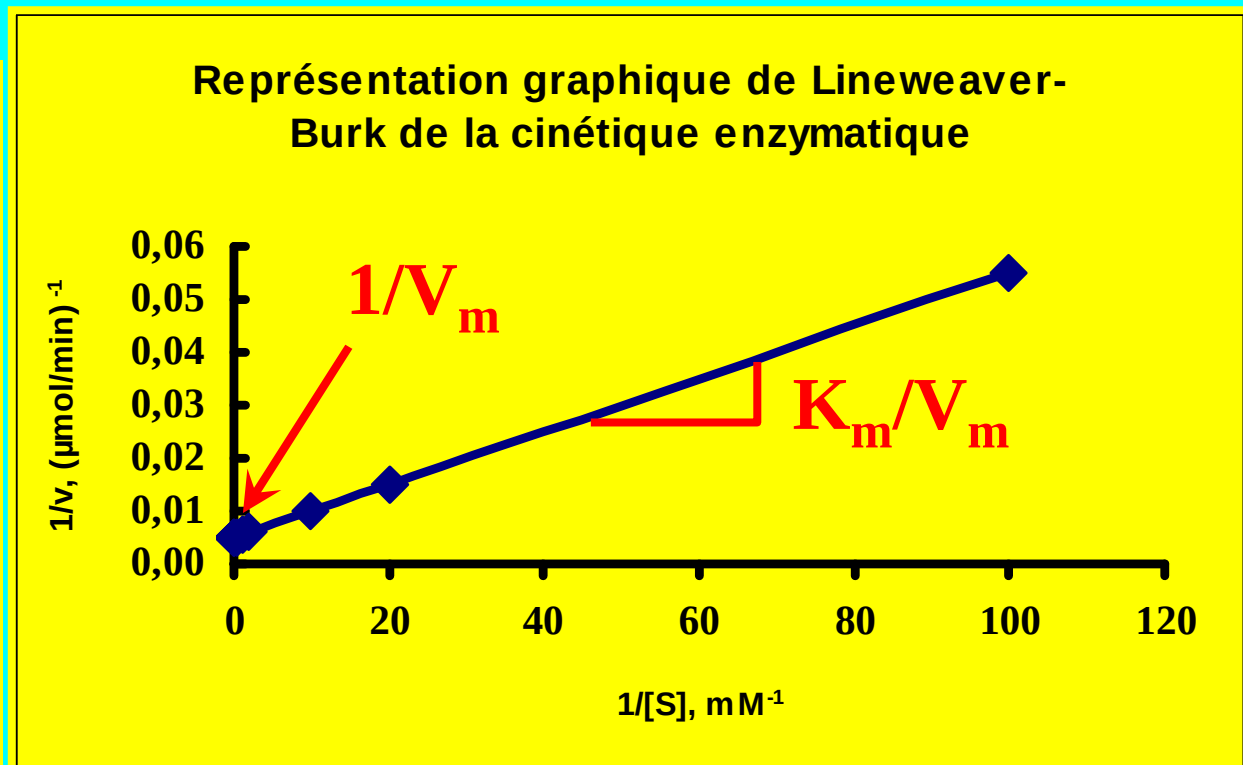


Calcul de V_m et de K_m

Représentation graphique en coordonnées inverses

Représentation graphique de Lineweaver-Burk

$1/[S], \text{mM}^{-1}$	$1/v$ $(\mu\text{mol}/\text{min})^{-1}$
100,000	0,055
20,000	0,015
10,000	0,010
2,000	0,006
1,000	0,006
0,200	0,005
0,100	0,005
0,050	0,005
0,025	0,005



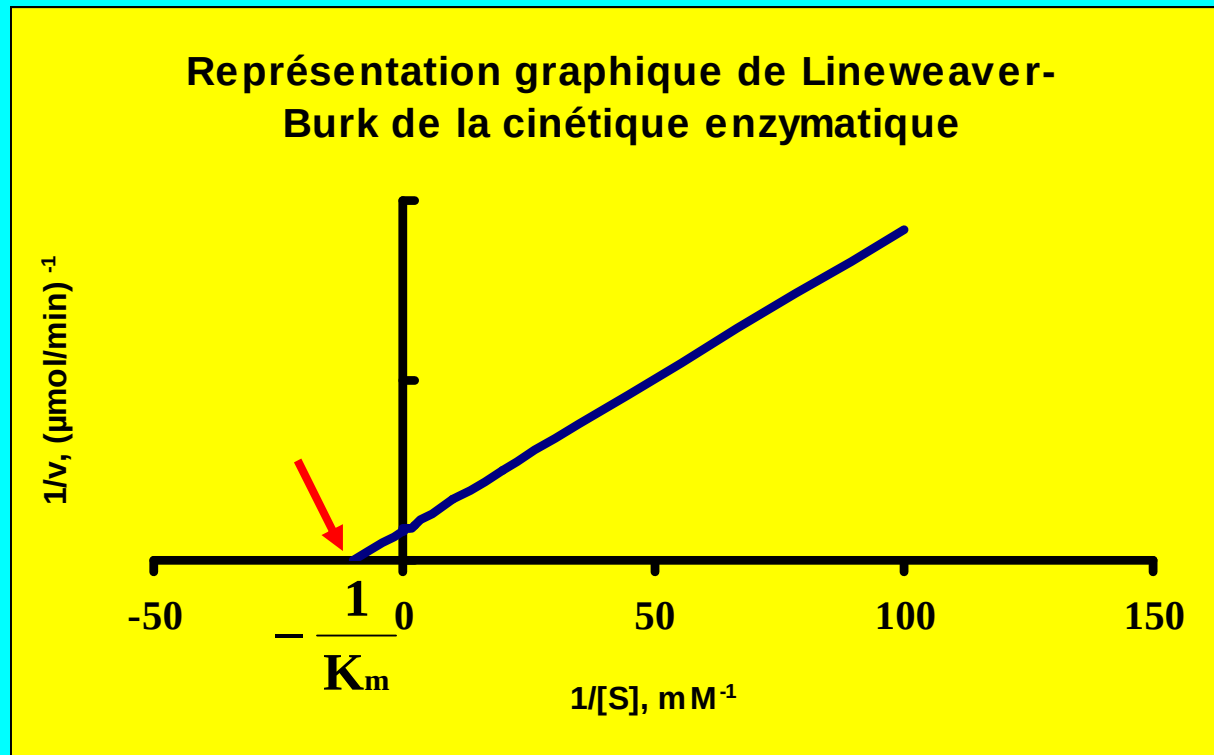
$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Calcul de V_m et de K_m

Représentation graphique en coordonnées inverses

Représentation graphique de Lineweaver-Burk



$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]}$$

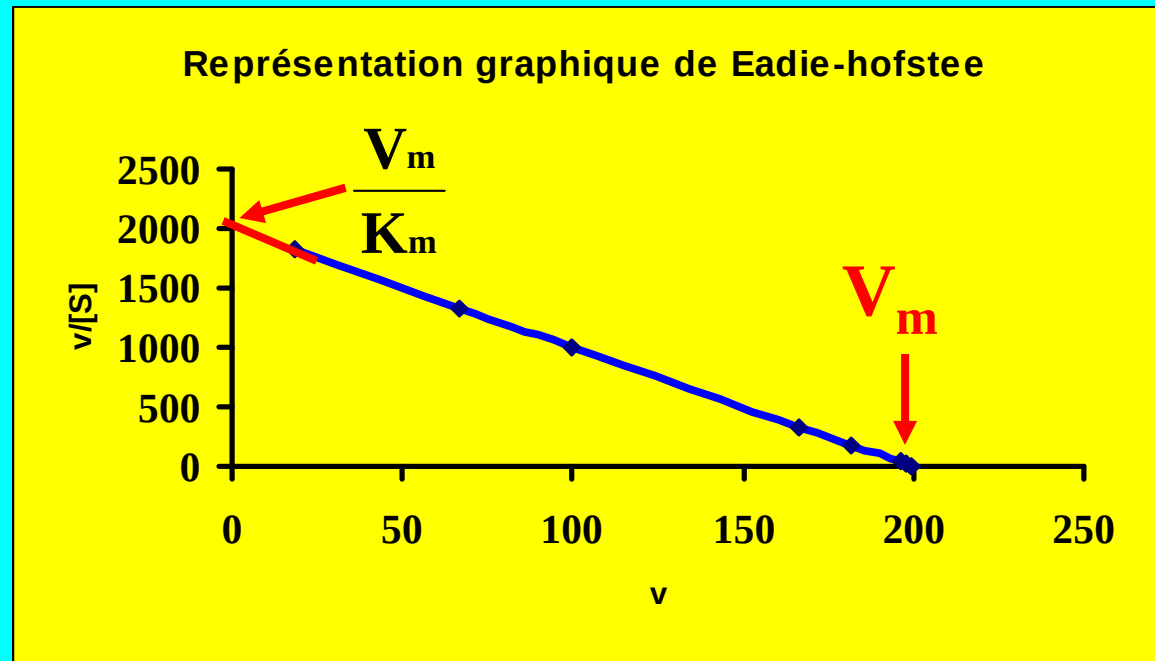
$$0 = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m}$$

Calcul de V_m et de K_m

Représentation graphique de Eadie-Hofstee

$v/[S]$	v
1818,18	18,18
1333,33	66,67
1000,00	100,00
333,33	166,67
181,82	181,82
39,22	196,08
19,80	198,02
9,95	199,00
4,99	199,50



$$\frac{v}{[S]} = -\frac{v}{K_m} + \frac{V_m}{K_m}$$

Calcul de V_m et de K_m

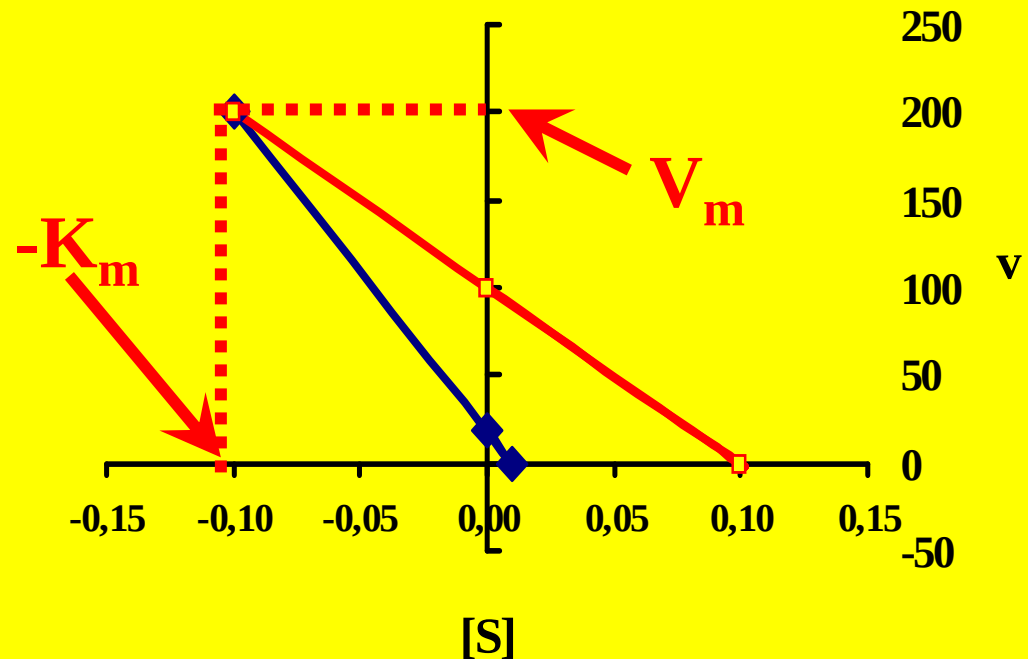
Représentation graphique de Eisenthal-Cornish-Bowden

	Droite D1	
	x	y
A1	0,00	18,18
B1	0,01	0,00

	Droite D2	
	x	y
A2	0,00	100,00
B2	0,10	0,00

[S], mM	v, $\mu\text{mol/min}$
0,000	0,000
0,010	18,182
0,050	66,667
0,100	100,000
0,500	166,667
1,000	181,818
5,000	196,078
10,000	198,020
20,000	199,005
40,000	199,501

Représentation graphique de Eisenthal-Cornish-Bowden



Calcul de V_m et de K_m

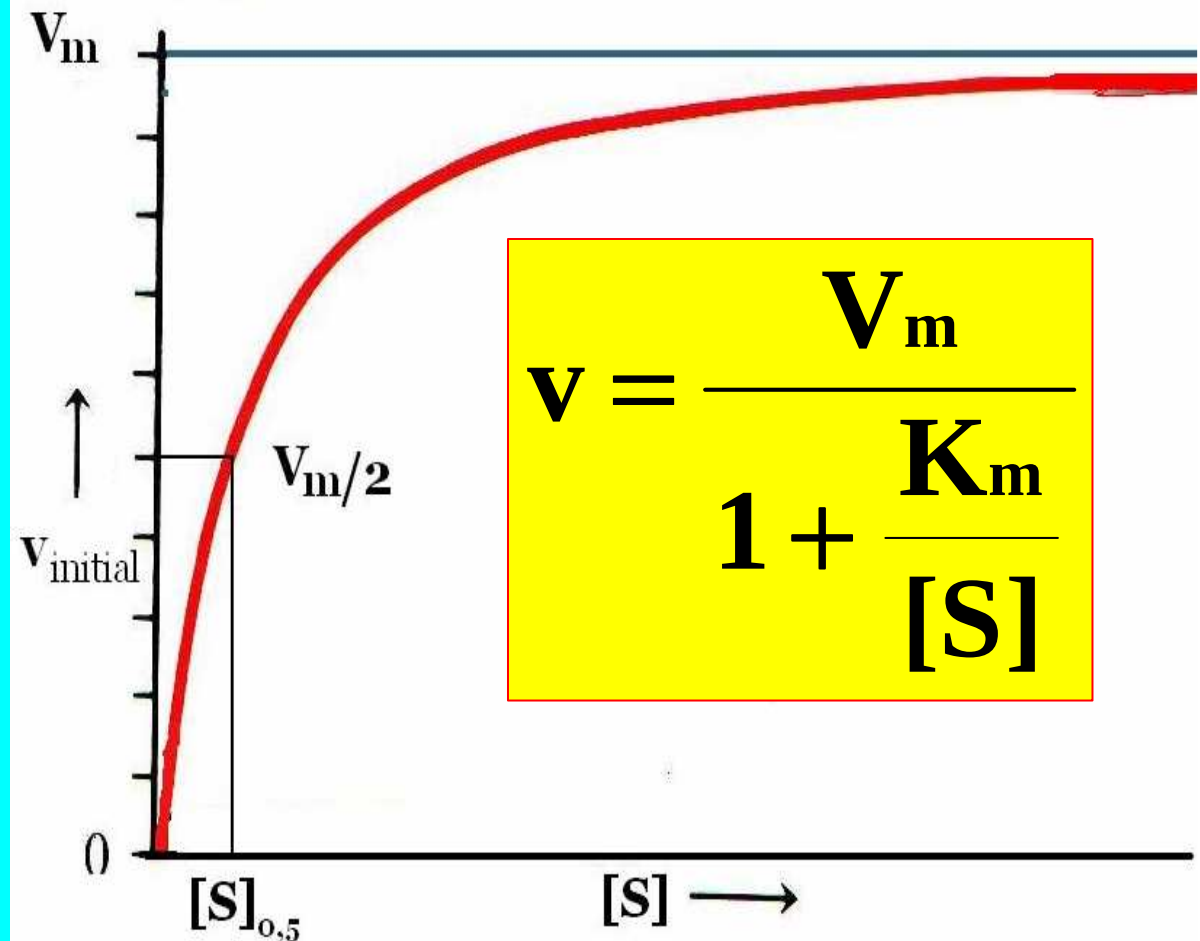
- Signification de V_m et K_m**

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0}{1 + \left(\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}} \right) \cdot \frac{1}{[S]}}$$

$$V_m = k_{cat} \cdot [E]_0$$

$$[S]_{0,5} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}}$$

C'est K_m



Calcul de V_m et de K_m

- Signification de V_m et K_m

V_m c'est la vitesse de la réaction quand la $[S]$ devient saturante.

Pour la quasi-totalité des enzymes la K_m représente la constante de dissociation; c'est l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat

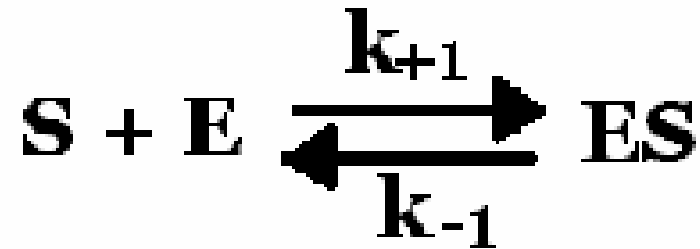
Calcul de V_m et de K_m

K_m est égale à K_s



$$k_{cat} \ll k_{+1} \text{ et } k_{-1}$$

Les conditions initiales
État stationnaire



$$k_{+1} \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES]$$

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s$$

Calcul de V_m et de K_m

- Signification de V_m et K_m

K_s est la constante de dissociation

S devient saturant quand $[S] \gg K_s$

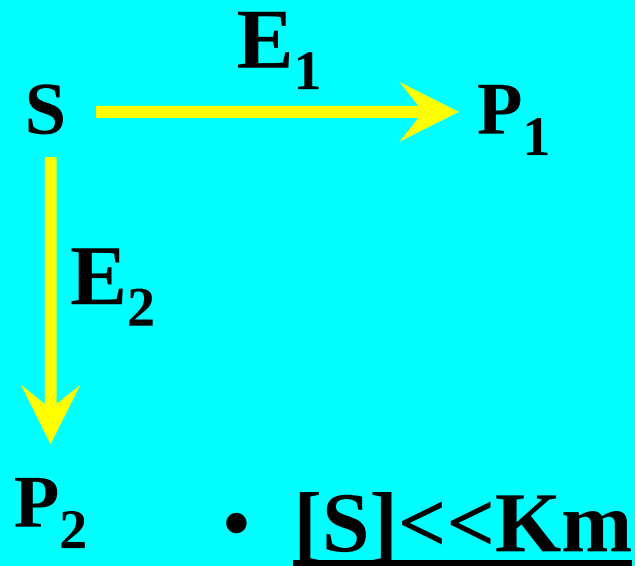
Soit approximativement. $10 \times K_s$

Dans ces conditions la $[E]$ libre devient négligeable et, approximativement, $[ES]$ est égale à $[E]_0$

Calcul de V_m et de K_m

- Efficacité de la catalyse enzymatique

C'est la vitesse de la réaction qui détermine l'efficacité de l'action catalytique. Quels sont les paramètres enzymatiques qui déterminent cette efficacité ? Est-ce K_m ou k_{cat} ?



$$v_1 = \frac{V_m}{K_{m1}} \cdot [S] = \frac{k_{cat1} \cdot [E_1]}{K_{m1}} \cdot [S]$$

$$v_2 = \frac{V_m}{K_{m2}} \cdot [S] = \frac{k_{cat2} \cdot [E_2]}{K_{m2}} \cdot [S]$$

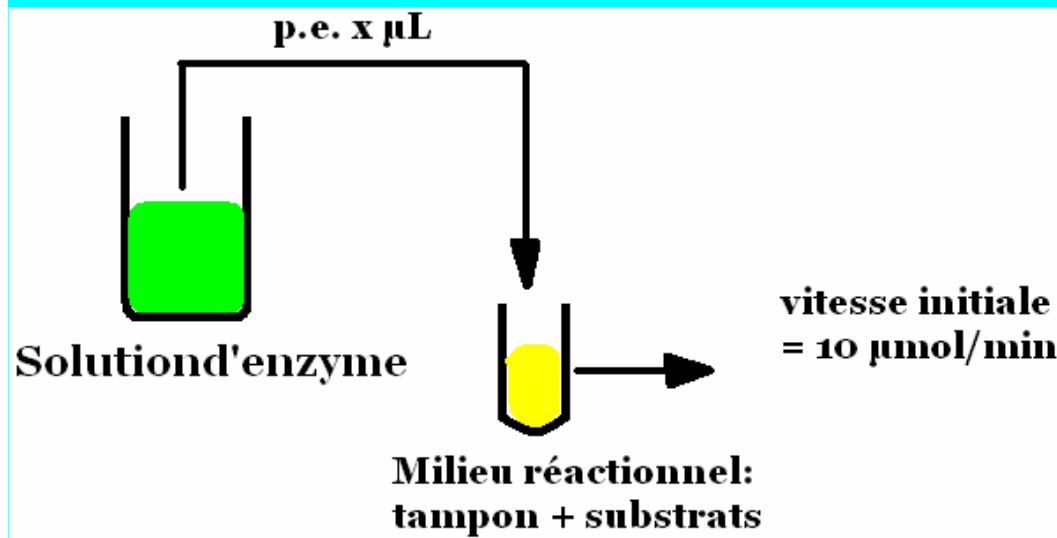
$$\frac{v_1}{v_2} = \frac{\frac{k_{cat1}}{K_{m1}}}{\frac{k_{cat2}}{K_{m2}}}$$

Calcul de V_m et de K_m

- Les unités

UI : Unité Internationale. C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une μmole de substrat/min

Comparer avec le katatal (kat)



**X μL de la solution
d'enzyme contiennent
10 UI.**

1 μL contient 10 UI/x.

Calcul de V_m et de K_m

- Les unités

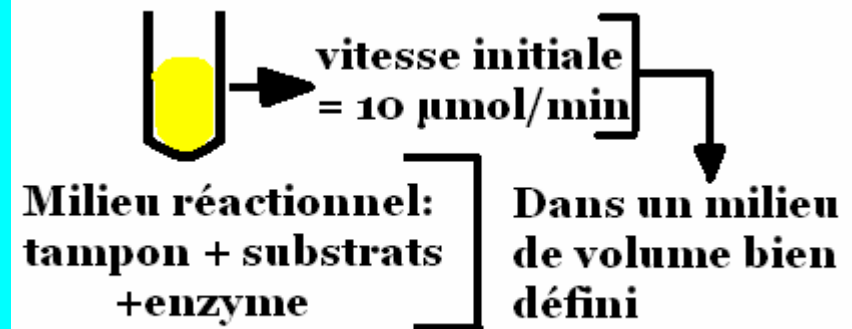
UI : Unité Internationale. C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une μmole de substrat/min

Cette définition, si elle est commode, n'est pas exacte.

Pourquoi ?

$$v = -\frac{d[S]}{dt}(t \rightarrow 0) = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t}$$

Conclusion



Calcul de V_m et de K_m

- **Activité et activité spécifique d'un enzyme**

L'activité de l'enzyme A c'est la V_m de la réaction

Activité spécifique de l'enzyme

Comme toute grandeur spécifique, l'AS de l'enzyme c'est l'activité par unité de quantité de l'enzyme :

1- En protéine

$$AS = A/\text{mg de protéine}$$

Calcul de V_m et de K_m

Activité spécifique de l'enzyme

1- La quantité de l'enzyme est exprimée moles

$$ASM = A/mol \text{ d'enzyme}$$

$$V_m = k_{cat} \cdot [E]_0$$

Donc

$$k_{cat} = V_m/[E]_0 = ASM$$

$$\begin{aligned} k_{cat} &= V_m/[E]_0 = x \text{ mol}_S L^{-1} \cdot \text{min}^{-1} / (y \text{ mol}_E \cdot L^{-1}) \\ &= x \text{ mol}_S \cdot \text{min}^{-1} / y \text{ mol}_E \end{aligned}$$

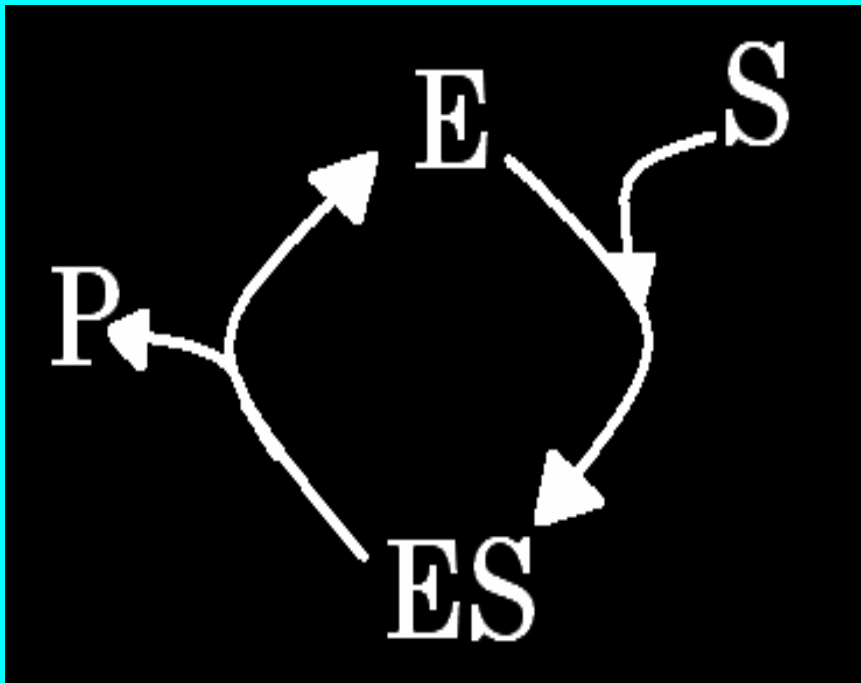
Peut on écrire $k_{cat} = x \text{ mol}_S \cdot \text{min}^{-1} / y \text{ mol}_E = (x/y) \text{ min}^{-1}$?

Calcul de V_m et de K_m

- **Signification de V_m**

Activité spécifique de l'enzyme

Peut on écrire $k_{cat} = x \text{ mol}_S \cdot \text{min}^{-1} / y \text{ mol}_E = (x/y) \text{ min}^{-1}$?



k_{cat} $\rightarrow$ ASM
 $\searrow$
« Turnover number »

Inhibition des réactions enzymatiques

- Définition d'un inhibiteur
- Deux catégories d'inhibiteurs

- Inhibiteurs irréversibles

- Liaison covalente avec l'enzyme : $E + I \rightarrow E-I$

100	20	
80	0	20

Destruction totale et irréversible de 20% de l'activité enzymatique

Inhibition des réactions enzymatiques

- Inhibiteurs réversibles



L'état d'équilibre est établi rapidement ;
approximativement dans les mêmes conditions que
celui du complexe ES.

La relation ci-dessus obéit aux lois d'action de masse :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

K_i est la constante d'équilibre dans le
sens de la dissociation.

Comme la K_m c'est aussi une
indication de l'inverse de l'affinité de
l'enzyme pour l'inhibiteur

Inhibition des réactions enzymatiques

- **Types d'inhibitions réversibles**

Le type d'inhibition dépend de la nature de liaison entre l'inhibiteur et l'enzyme

Nous considérons ici seulement trois types d'inhibitions :

- L'inhibition compétitive**

- L'inhibition non-compétitive**

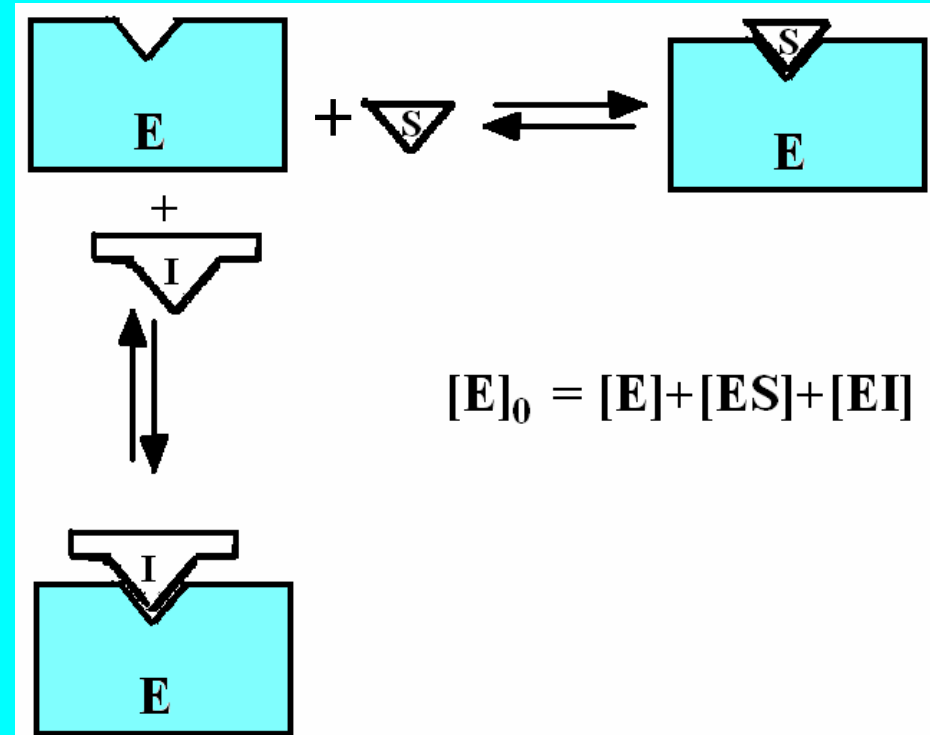
- L'inhibition in-compétitive**

Inhibition des réactions enzymatiques

- L'inhibition compétitive

$$[E] = [ES] \cdot \frac{K_m}{[S]} \quad [EI] = [E] \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

$$v = k_{cat} \cdot [ES]$$



$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E]_0}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

Inhibition des réactions enzymatiques

- L'inhibition compétitive**

Vitesse initiale en $\mu\text{M}.\text{min}^{-1}$



[S], μM	[I]=0 μM	[I]=10 μM	[I]=25 μM
1	9,09	3,23	1,69
2	16,67	6,25	3,23
4	28,57	11,77	6,25
6	37,50	16,67	9,09
8	44,44	21,05	11,77
10	50,00	25,00	14,29
20	66,67	40,00	25,00
30	75,00	50,00	33,33
40	80,00	57,14	40,00
50	83,33	62,50	45,46

Inhibition des réactions enzymatiques

• L'inhibition non-compétitive

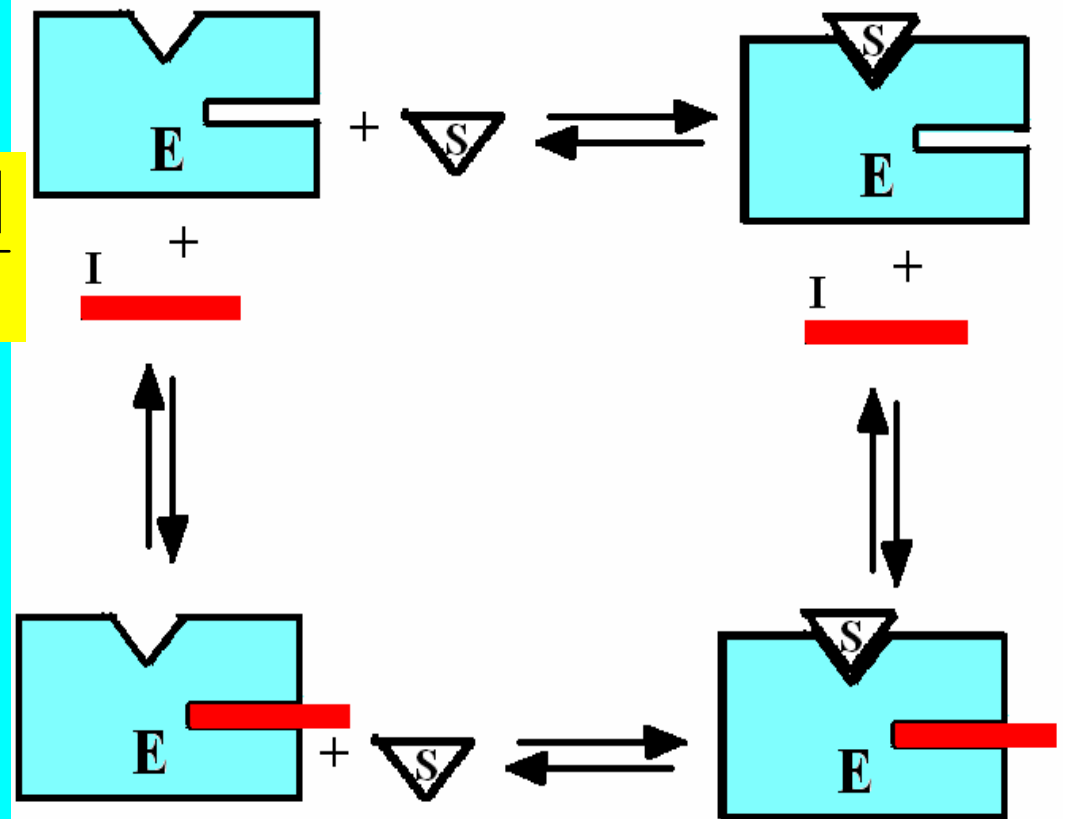
$$v = k_{\text{cat}} \cdot [\text{ES}]$$

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] + [\text{ESI}]$$

$$[\text{E}] = [\text{ES}] \cdot \frac{K_m}{[\text{S}]} \quad [\text{EI}] = [\text{E}] \cdot \frac{[\text{I}]}{K_i}$$

$$[\text{ESI}] = [\text{ES}] \cdot \frac{[\text{I}]}{K_i}$$

$$v = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \left(1 + \frac{K_m}{[\text{S}]}\right)}$$



Inhibition des réactions enzymatiques

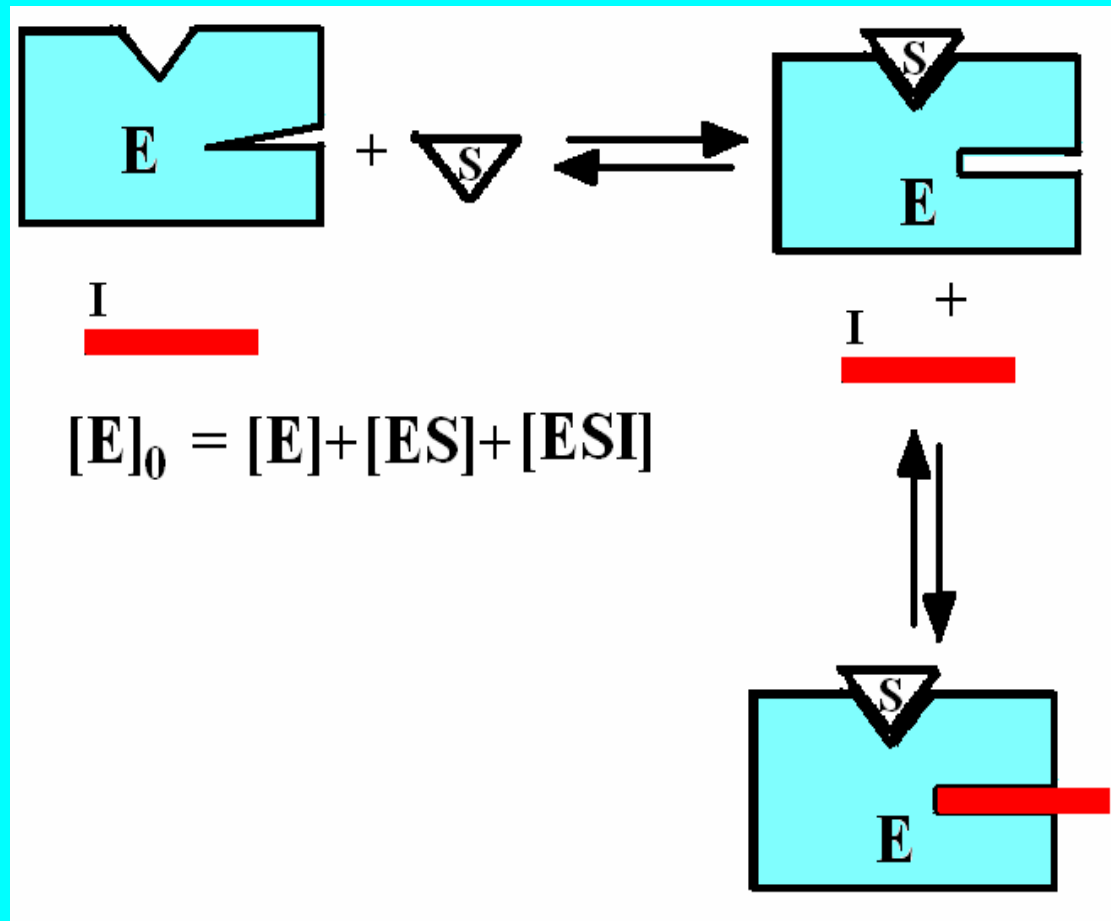
- L'inhibition in-compétitive**

$$v = k_{\text{cat}} \cdot [\text{ES}]$$

$$[\text{E}] = [\text{ES}] \cdot \frac{K_m}{[\text{S}]}$$

$$[\text{ESI}] = [\text{ES}] \cdot \frac{[\text{I}]}{K_i}$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[\text{S}]} + \frac{[\text{I}]}{K_i}}$$



V. PRÉPARATIONS ET DOSAGES ENZYMATIQUES

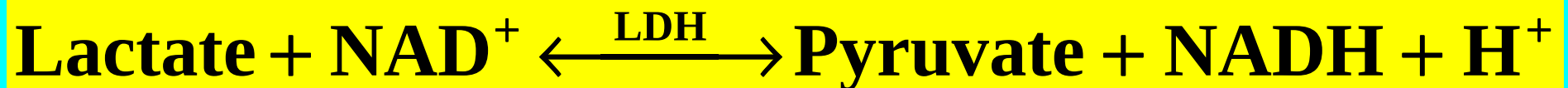
Dosages enzymatiques : 1. Les composés dosés

Les dosages enzymatiques consistent à utiliser une réaction catalysée par un enzyme pour déterminer les concentrations des composés impliqués directement dans la réaction ou les composés qui peuvent être associés à cette réaction

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.1. Les composés impliqués dans la réaction enzymatique

Les activités enzymatiques, les substrats et éventuellement les coenzymes Exemple :



Cette réaction peut être utilisée dans un sens comme dans l'autre pour doser : Le lactate, le NAD^+ , le pyruvate ou le $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Mais cette réaction est aussi utilisée pour doser l'activité de l'enzyme la **LDH** ; la **lactate déshydrogénase**

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

a) Les Inhibiteurs

- Les Inhibiteurs compétitifs

$$K_{\text{Minhib}} = K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

La K_m en présence de l'inhibiteur (K_{Minhib}) est fonction de la $[I]$, ce qui donne un moyen de déterminer cette concentration en calculant la $[S]_{1/2}$ en absence et en présence d'inhibiteur

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

a) Les Inhibiteurs

- Les Inhibiteurs non-compétitifs

$$V_{\text{Minhib}} = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

La V_m en présence de l'inhibiteur (V_{minhib}) est divisée par un facteur proportionnel à la $[I]$, ce qui donne un moyen de déterminer cette concentration en calculant la V_m en absence et en présence d'inhibiteur

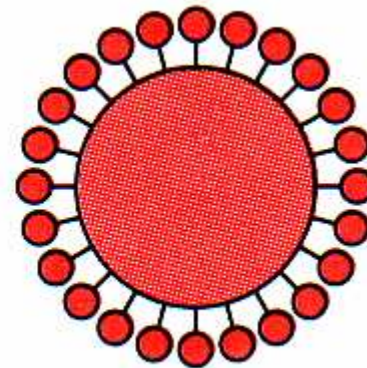
V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

b) Les anticorps ou les antigènes (diapositive 1/5)



**A doser : l'enveloppe protéique
du virus du SIDA**



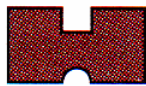
V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

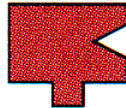
b) Les anticorps ou les antigènes (suite diapositive 2/5)

2

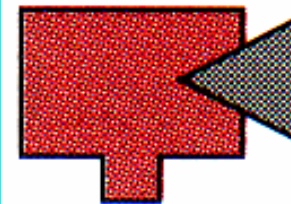
On prépare :



IgG de lapin contre la
protéine virale du SIDA

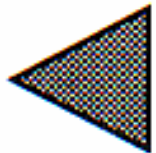


IgG de chèvre
(Protéine rapporteur)
contre les anticorps de lapin



Péroxydase de
raifort

IgG de chèvre



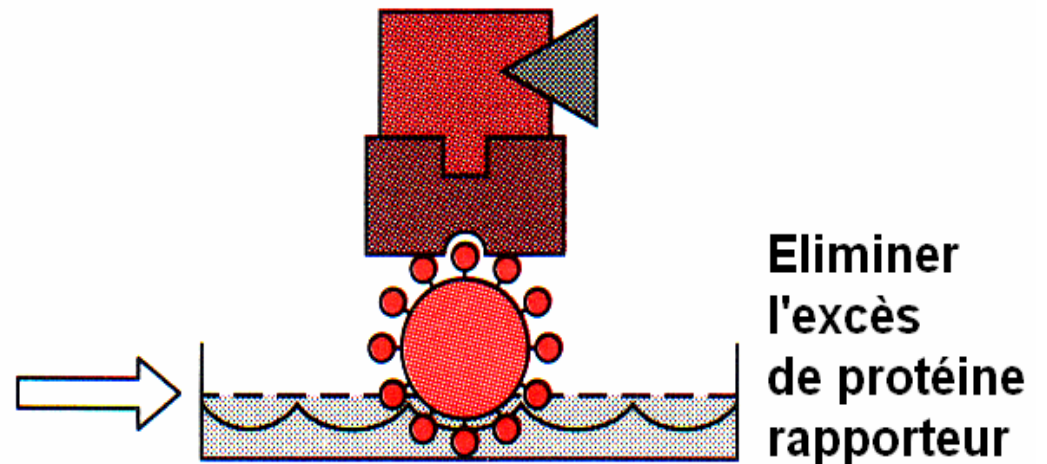
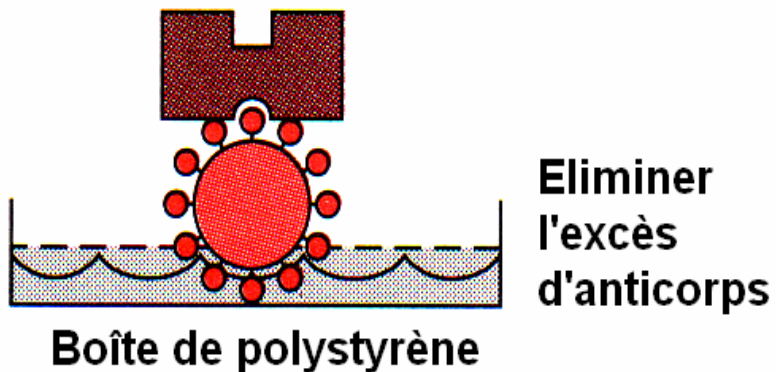
Lier la Péroxydase de
raifort aux IgG de chèvre

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

b) Les anticorps ou les antigènes (suite diapositive 3/5)

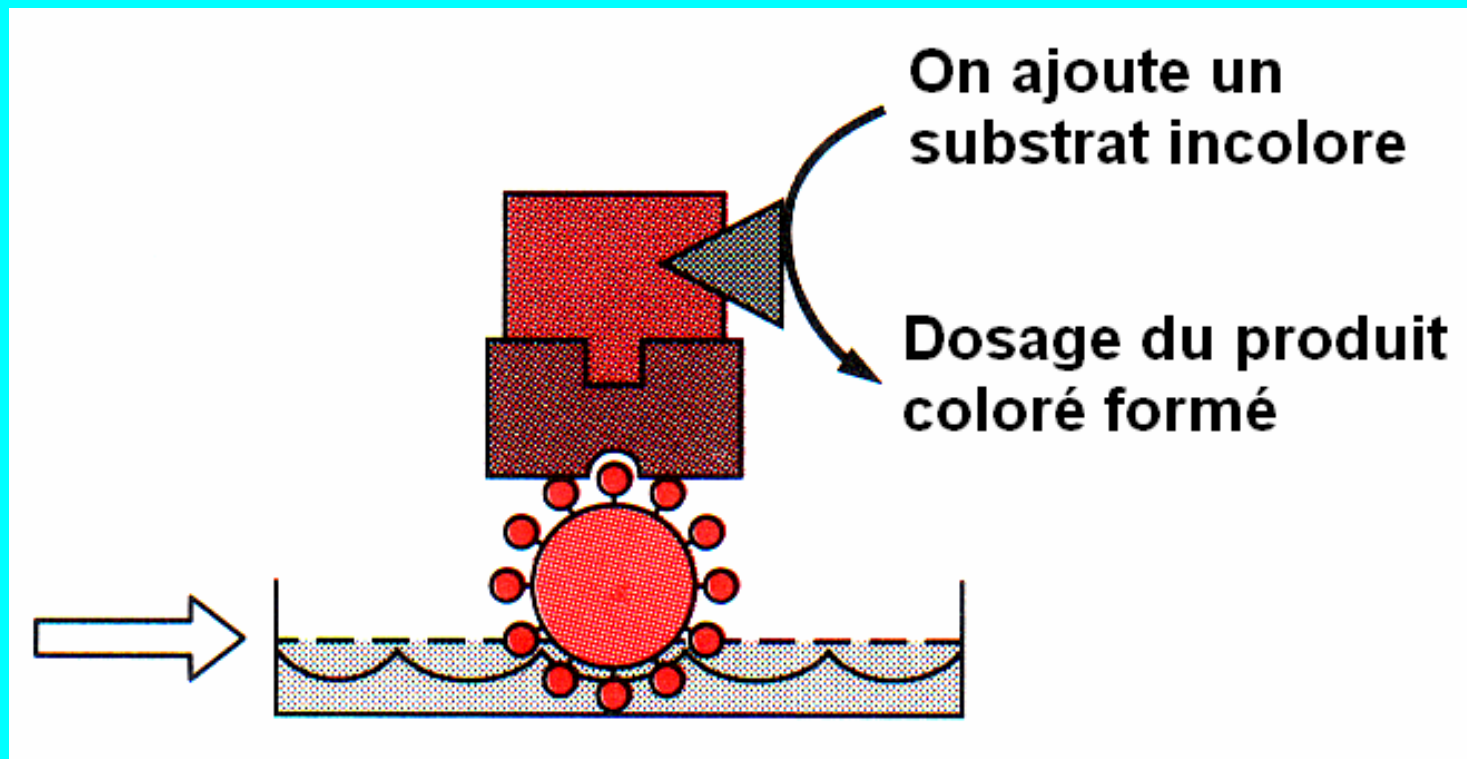
3 Le test pour le virus du SIDA



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

b) Les anticorps ou les antigènes (suite diapositive 4/5)



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

1.2. Les composés Associés à la réaction enzymatique

b) Les anticorps ou les antigènes (suite diapositive 5/5)

La vitesse de la formation du produit coloré est directement proportionnelle à la quantité de peroxydase présente dans la boîte de polystyrène. Cette quantité est elle-même égale à la quantité de la protéine virale du SIDA

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

Les techniques utilisées servent à détecter et quantifier un des composés de la réaction.

Elles dépendent des propriétés physiques et physico-chimiques des composés de la réaction.

Le composé détecté peut être différent de celui qu'on veut doser, ce qui est souvent le cas, il est donc impératif de connaître la relation stœchiométrique entre les deux composés

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

- Distinction entre technique et méthode

Avant de donner quelques exemples des techniques utilisées en dosage enzymatique, il est important de ne pas confondre **technique et méthode**

Comme nous le venons de le définir, une **technique** est un procédé physique ou physico-chimique mis en œuvre pour **détecter et quantifier un composé**

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

- Distinction entre technique et méthode

Une **méthode**, en revanche, est l'ensemble de démarches, concepts et modèles appliqués pour aboutir au dosage.

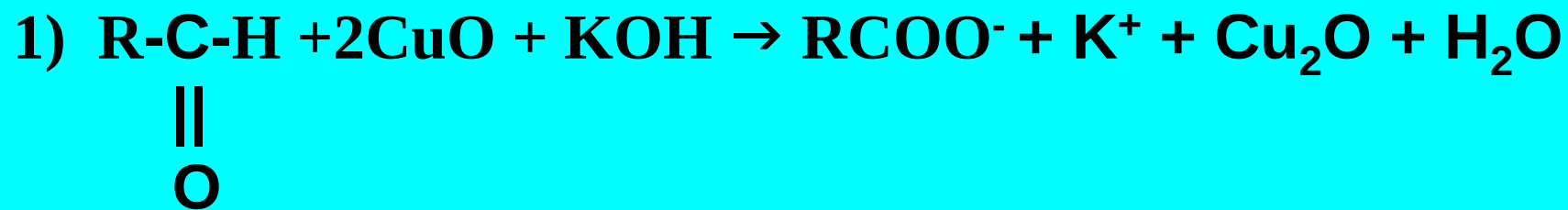
Prenons l'exemple du **dosage du glucose** pour illustrer cette distinction.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

- Distinction entre technique et méthode

Il existe plusieurs méthodes pour le dosage du glucose. Aujourd'hui c'est la méthode enzymatique grâce à sa spécificité qui prédomine. Prenons seulement comme exemples : 1) la méthode basée sur le pouvoir réducteur du glucose et 2) la méthode enzymatique.



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

- Distinction entre technique et méthode

L'oxyde cuivreux issu de la réaction est dosé : soit par réduction d'un réactif phospho-tungsto-molybdique : méthode de Folin et Wu, soit par réduction d'un réactif arsénio-molybdique : méthode de Nelson-Somogyi. Dans les deux cas la détection se fait par colorimétrie et la quantification par l'équation de Beer-lambert.

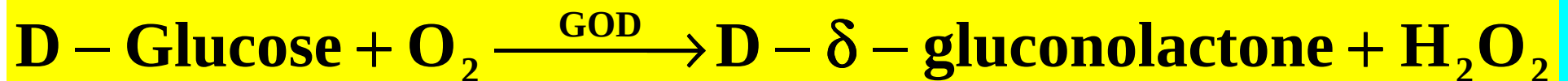
Cependant cette méthode n'est pas spécifique et ne peut pas distinguer, notamment dans un extrait biologique, entre différents sucres réducteurs.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

- Distinction entre technique et méthode

2) la méthode enzymatique est très spécifique du glucose. La glucose oxydase (GOD) catalyse spécifiquement la réaction suivante :



Pour la technique on peut utiliser la potentiométrie (électrode à oxygène) pour doser la disparition de l'oxygène ou une technique colorimétrique pour doser l'apparition de l'eau oxygénée.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les techniques utilisées

La plupart des techniques utilisées font appel aux méthodes spectrophotométriques : soit par absorbance, soit par fluorescence. Ces dernières sont plus sensibles ; la détection par fluorescence est 1000 fois plus sensible que la détection par absorbance

Nous donnerons quelques exemples lors de l'étude des méthodes de dosage enzymatique

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. La méthode en point-final

Cette méthode consiste à déterminer la variation de la concentration d'un des composés de la réaction entre le début et la fin de la réaction.

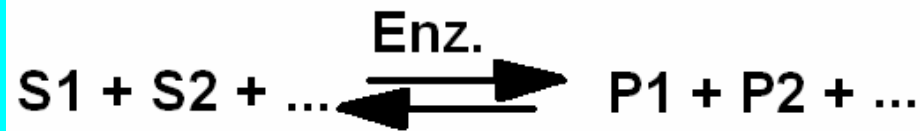
Cette méthode ne s'applique qu'au dosage des substrats de la réaction. On ne peut pas l'utiliser pour doser les activités enzymatiques.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

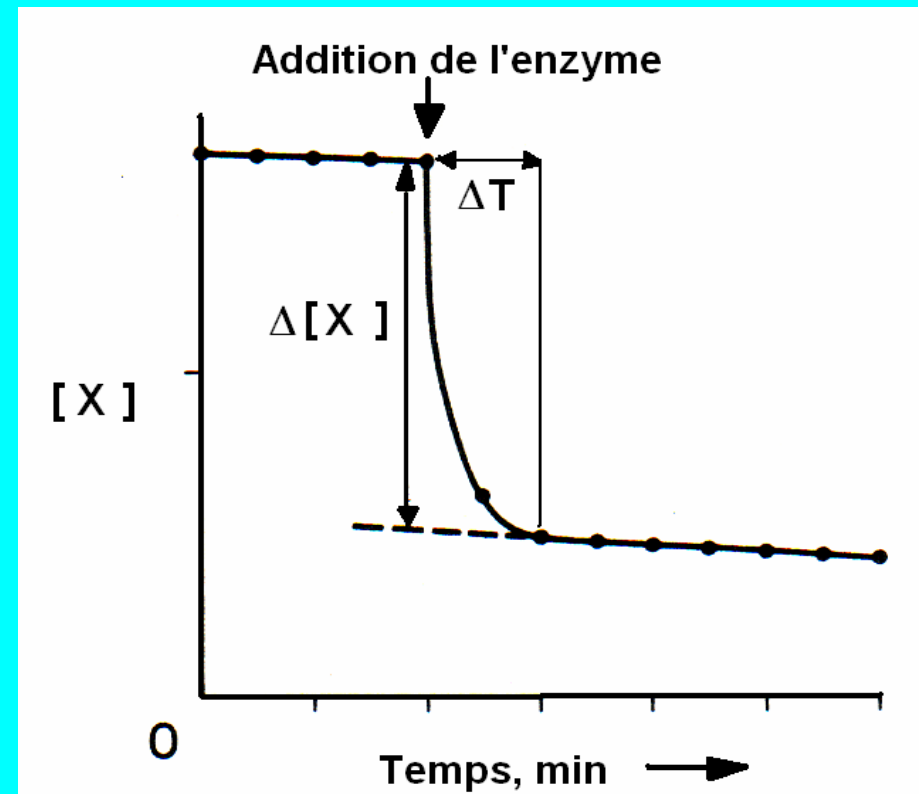
2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. La méthode en point-final

Soit le dosage du composé S1



Quels sont les problèmes à résoudre pour rendre un tel dosage possible ?



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. La méthode en point-final. Dosage de S1

1) Il faut que la réaction soit totale : $[S1]_f \approx 0$



2) Il faut : - une détection aisée et quantifiable du composé X. - $[X] \geq [S1]$. **X peut être n'importe quel composé de la réaction.**

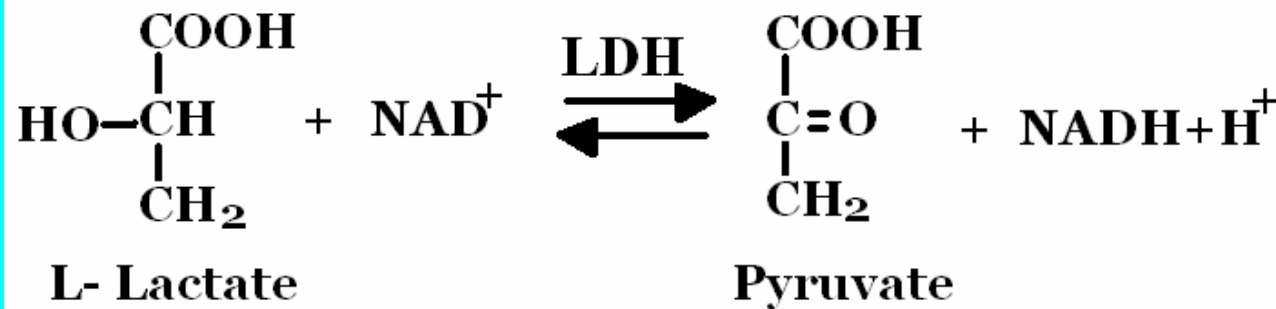
3) La durée de la réaction (ΔT) doit être la plus courte possible.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. Problème lié à la technique

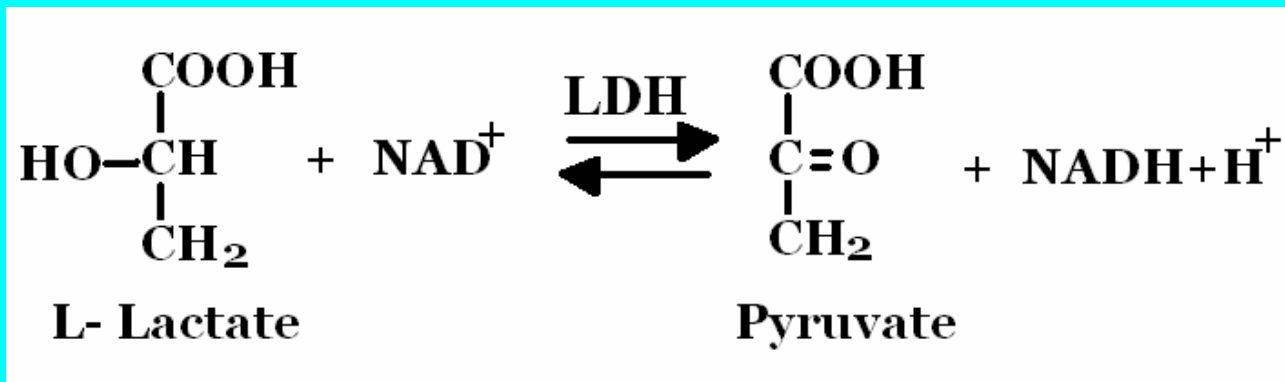
Prenons l'exemple de la réaction catalysée par la LDH pour illustrer ces trois problèmes et les solutions possibles



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à la technique**



Une mole de lactate réagit avec une mole de NAD^+ qui produit une mole de $\text{NADH} + \text{H}^+$

Donc $([\text{Lac}]_0 - [\text{Lac}]_f) = \Delta[\text{NAD}^+] = \Delta[\text{NADH} + \text{H}^+]$

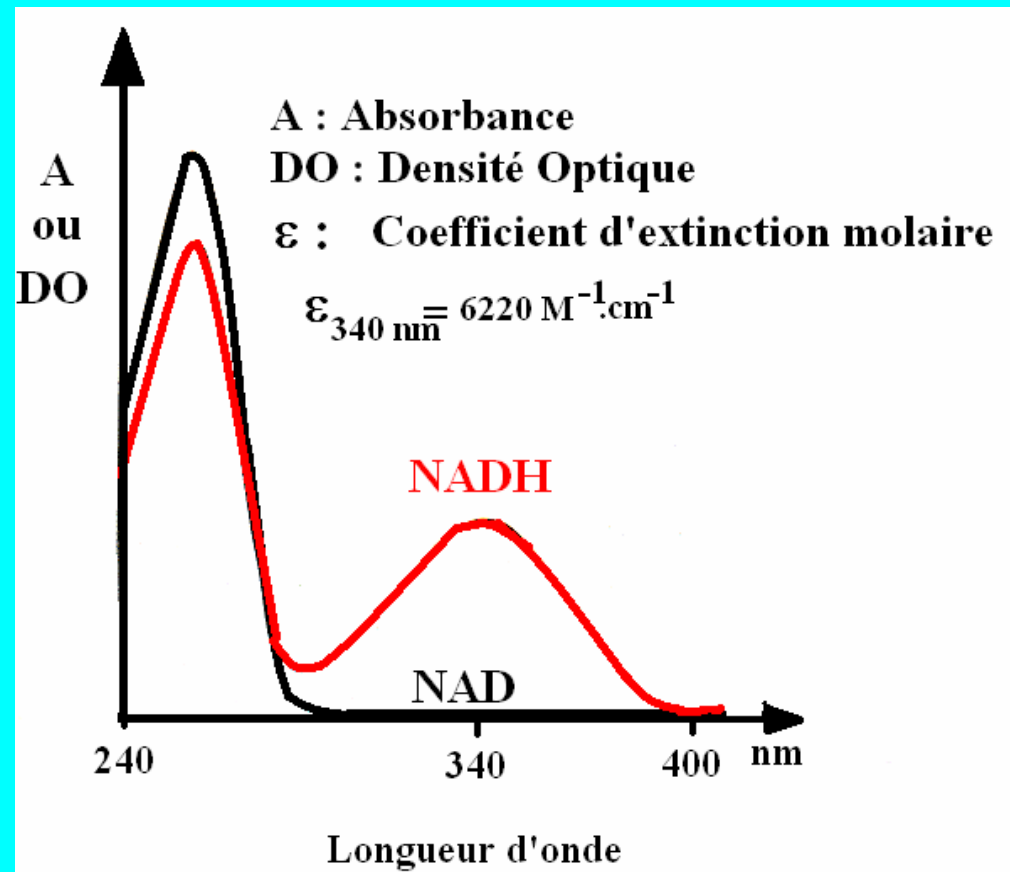
V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final.

Problème lié à la technique

Propriétés spectrales du couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$.



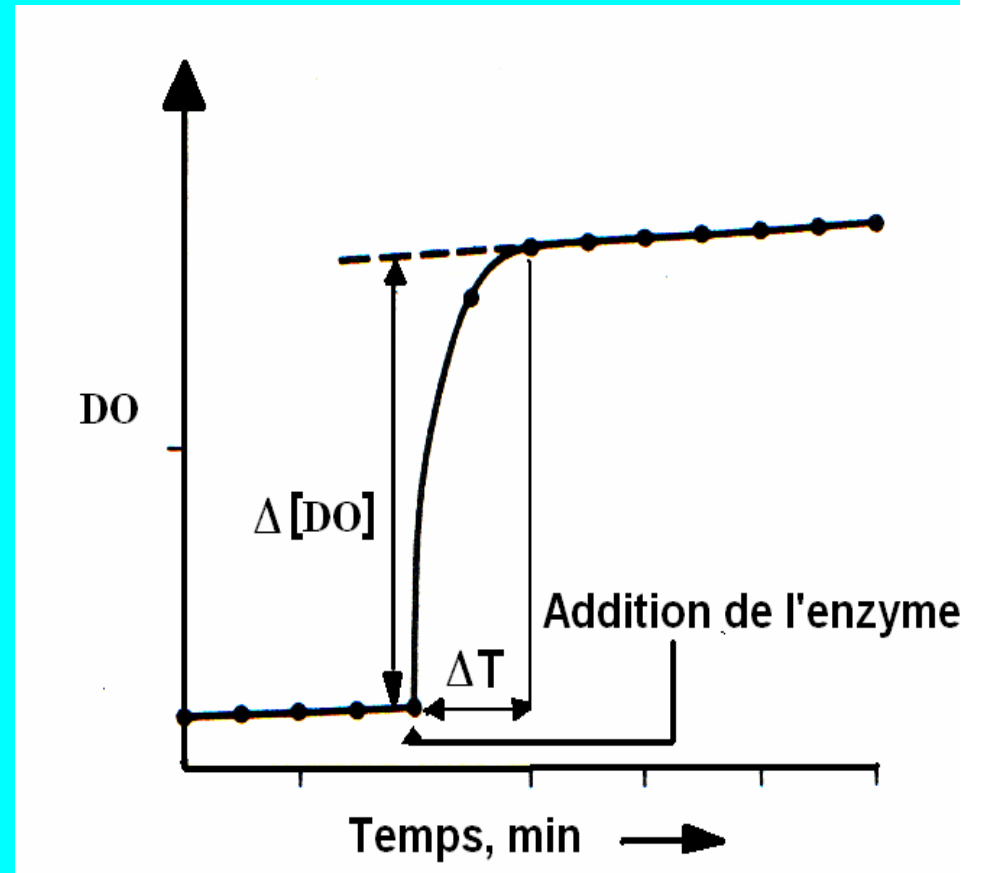
V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à la technique**

A partir de la relation $\Delta DO = \epsilon \cdot [NADH] \cdot l$, on peut calculer la concentration totale de lactate.

Donc, la technique utilisée dans ce dosage est spectrophotométrique

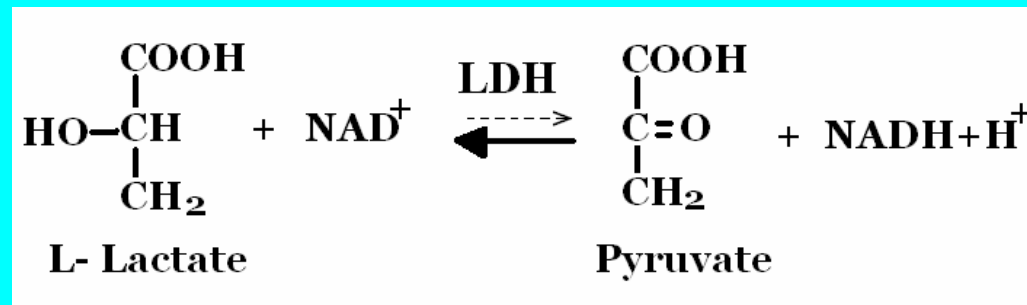


V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à l'équilibre**

Cependant, l'équilibre de la réaction n'est pas favorable à la transformation du lactate, bien au contraire.



Une K_{eq} de $2,5 \cdot 10^{-12}$ montre qu'une infime partie du lactate sera seulement transformée avant que la réaction inverse ne devienne prédominante.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à l'équilibre**

La solution est de

Déplacer l'équilibre de la réaction dans un sens favorable à la transformation du composé à doser.

Deux moyens sont utilisés :

- Précipiter un des composés de la réaction**
- Couplage de deux ou plusieurs réactions**

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à l'équilibre**

- Précipiter un des composés de la réaction

Ce procédé est surtout utilisé avec les réactions dont un des produits est un composé carbonyle

1) En ajoutant dans le milieu réactionnel de l'hydroxylamine on obtient une oxime ou de l'hydrazine qui donne des hydrazones ; ce qui fait déplacer la réaction dans le sens voulu.

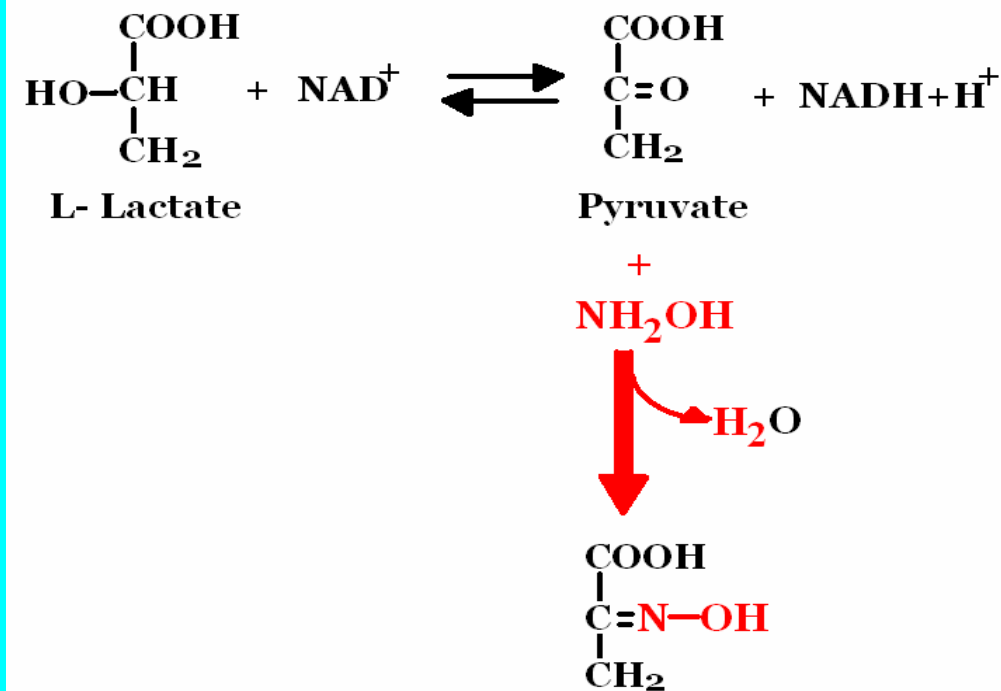
V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à l'équilibre**

- Précipiter un des composés de la réaction

**Formation
d'oximes**



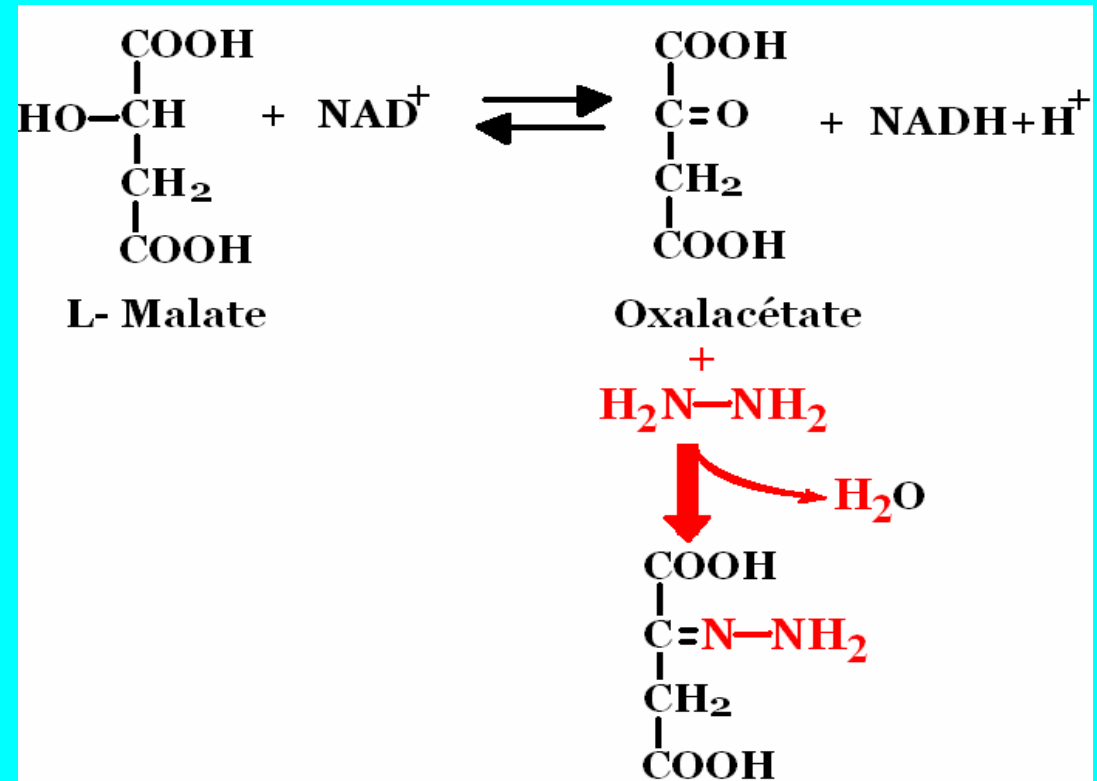
V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. Problème lié à l'équilibre

- ## - Précipiter un des composés de la réaction

Formation d'hydrazones



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.1. Méthode en point-final. **Problème lié à l'équilibre**

- Couplage de réactions

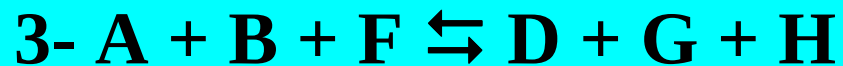
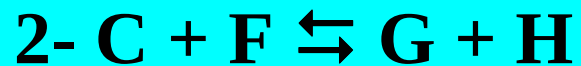
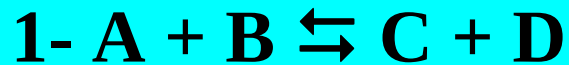
Le **couplage** de réactions peut **résoudre** les deux problèmes cités ci-dessus à savoir celui de **l'équilibre** et celui de la **technique** du dosage

Une règle impérative à connaître : pour être couplées, deux réactions doivent avoir un **intermédiaire commun**.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.2. Couplage de réactions. Intermédiaire commun



En solution, il en résulte comme s'il s'agissait d'une seule réaction dont l'équation n'est d'autre que la somme algébrique des deux autres

Si le composé C disparaît de l'équation, il n'a pas pour autant disparu de la réaction ; cette écriture veut dire simplement que sa concentration reste constante

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.2. Couplage de réactions. Intermédiaire commun

- Sens de la réaction globale

Le sens de la réaction globale doit être favorable à la transformation totale du composé à doser. Une des réactions par conséquent doit être irréversible ou fortement déplacé dans le sens voulu. Pour ce faire on peut faire appel à plus d'une réaction

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

- Système de réactions couplées. Réaction auxiliaire et réaction indicatrice

- Réaction auxiliaire. La réaction auxiliaire est la réaction qui transforme le substrat à doser

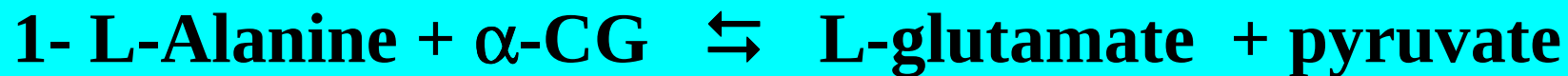
- Réaction indicatrice. La réaction indicatrice est la réaction qui fournit le composé qu'on peut détecter par des techniques qu'on souhaite simples et peu coûteuses

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

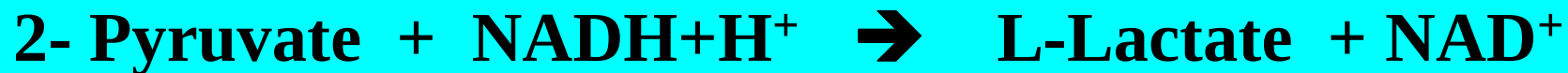
2. Les méthodes de dosage enzymatique

- Le couplage de la réaction auxiliaire et de la réaction indicatrice est direct

AAT



LDH



AAT + LDH



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

- Le couplage de la réaction auxiliaire et de la réaction indicatrice est indirect

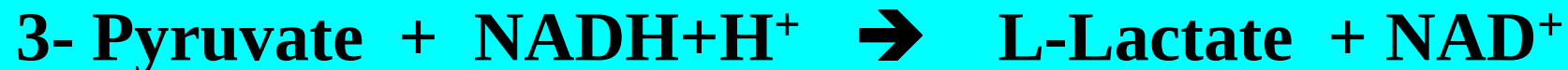
GK



PK



LDH



GK,PK,



LDH

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

- Réaction indicatrice postérieure et réaction indicatrice antérieure

Une réaction *indicatrice postérieure* dérive un de ses substrats des produits de la réaction auxiliaire ou de la dernière réaction du système de réactions qui lui sert d'intermédiaire avec la réaction auxiliaire.

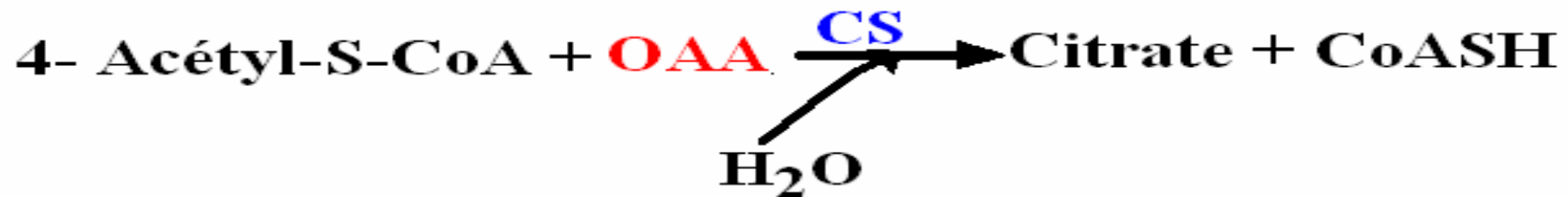
En revanche, un des produits de la réaction *indicatrice antérieure* servira de substrat pour une des réactions du système de réactions auxiliaires.

Les exemples ci-dessus sont des exemples de réactions indicatrices antérieures

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

- Réaction indicatrice postérieure et réaction indicatrice antérieure

Réaction indicatrice antérieure



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

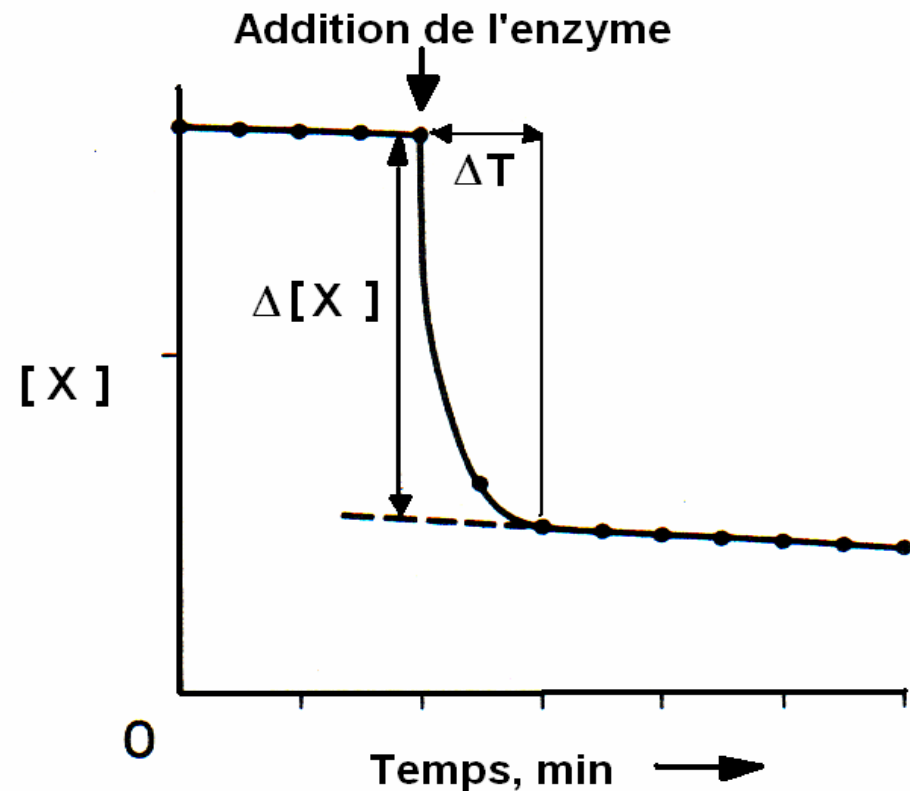
2.1. Méthode en point-final. Problème lié à la durée de la réaction ; ΔT est trop grand...

Exemple
pour simplifier le calcul.

Si $[S]_0 \leq 0,1K_M$,
et $[S]_t = 0,01[S]_0$
on peut considérer

$$v = \frac{V_m}{K_M} [S] = -\frac{d[S]}{dt}$$

$$\Delta T = \text{Ln}100 \cdot \frac{K_M}{V_m} = \text{Ln}100 \frac{K_M}{k_{\text{cat}} [E]_0}$$



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

2.2. Méthodes cinétiques

Les méthodes cinétiques consistent à utiliser la **vitesse de la réaction** (*se rappeler ; toujours la vitesse initiale*) comme paramètre pour calculer les concentrations des composés ou de l'activité de l'enzyme impliquées dans la réaction.

Les conditions du milieu (pH, température et Γ doivent être rigoureusement contrôlées et maintenues constantes.

A titre d'exemple on note que le Q_{10} d'une activité enzymatique est égale à 2

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

a. Méthode cinétique simple

- Dosage de l'activité enzymatique ;

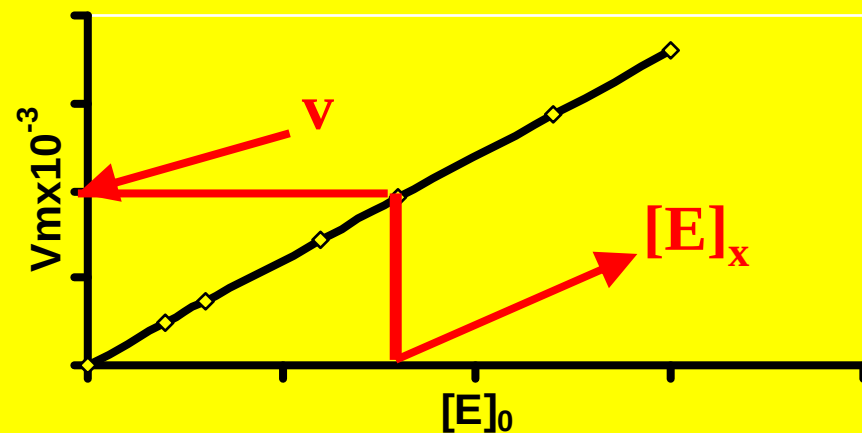
$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

[S] est saturante

$[S] \gg K_M$

$$v = V_m = k_{cat} \cdot [E]_0$$

vitesse de la réaction quand [S] est saturante



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

a. Méthode cinétique *simple*

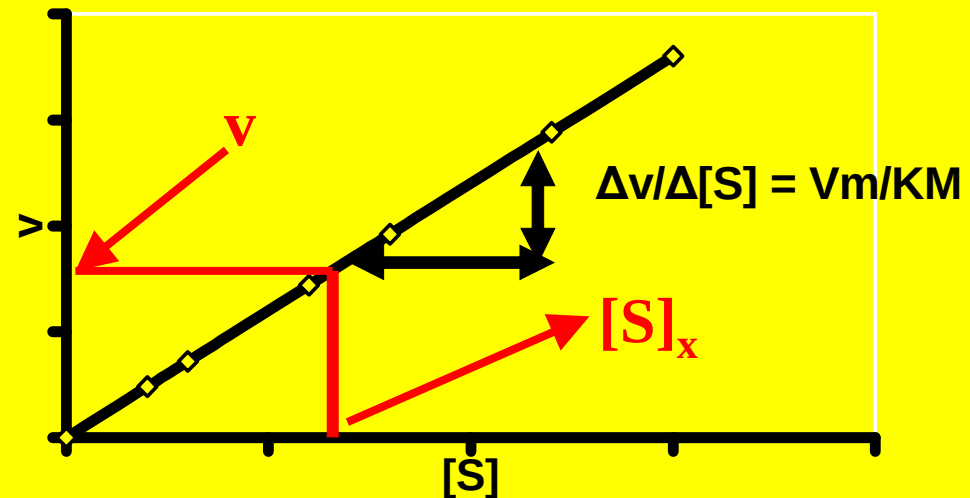
- Dosage du substrat ;

[S] est très inférieure à K_M [S] $\ll K_M$

$$v = \frac{V_m}{K_M} \cdot [S]$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

vitesse de la réaction quand [S] est très inférieure à K_M



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

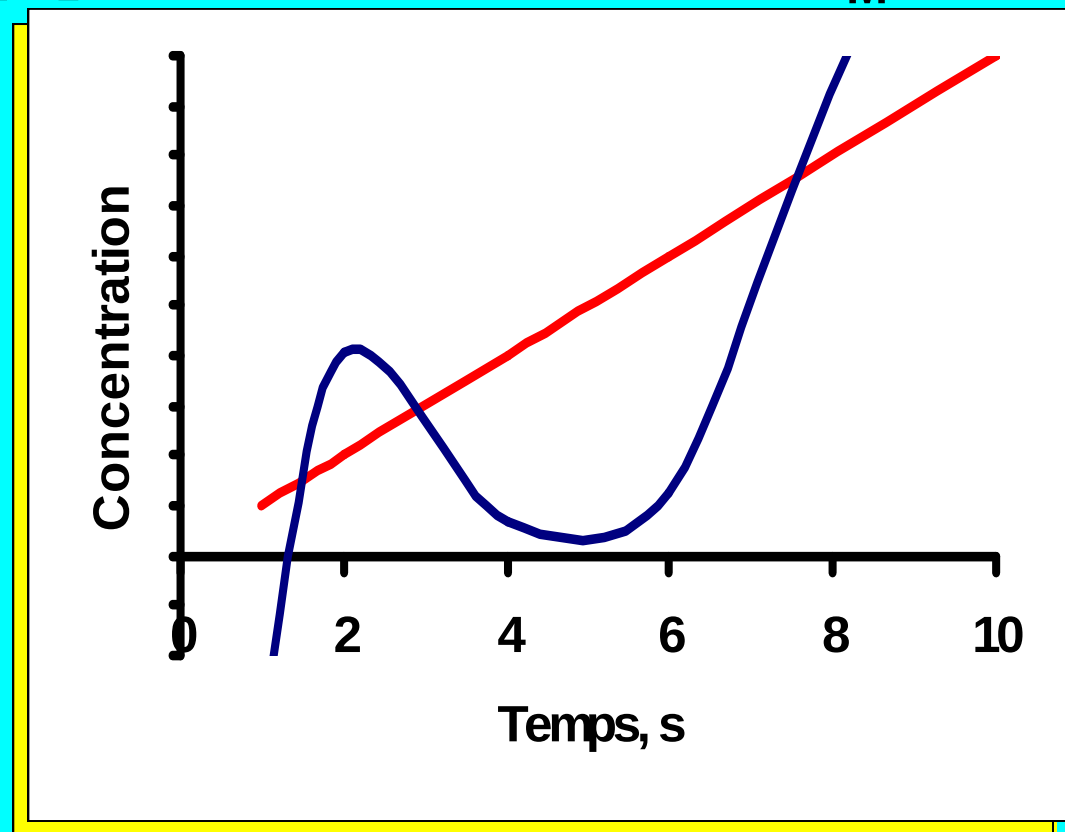
b. Méthode cinétique catalytique

Dosage du substrat ; $[S]$ est très inférieure à K_M .

C'est le cas idéal où

$$v = k \cdot [S] = (V_m/K_M) \cdot [S]$$

- Cependant la concentration du substrat est trop faible pour être détecter.



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

*b. Méthode cinétique **catalytique***

Dosage du substrat ; $[S]$ est très inférieure à K_M ,
mais trop faible pour être détecter

Pour surmonter cette difficulté on a introduit une variante de la méthode cinétique qu'on a appelé la **méthode catalytique**

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

*b. Méthode cinétique **catalytique***

Cette méthode consiste, 1) à intégrer le composé à doser dans un système de réactions qui le régénèrent en permanence,

2) à coupler ce système à une réaction indicatrice,

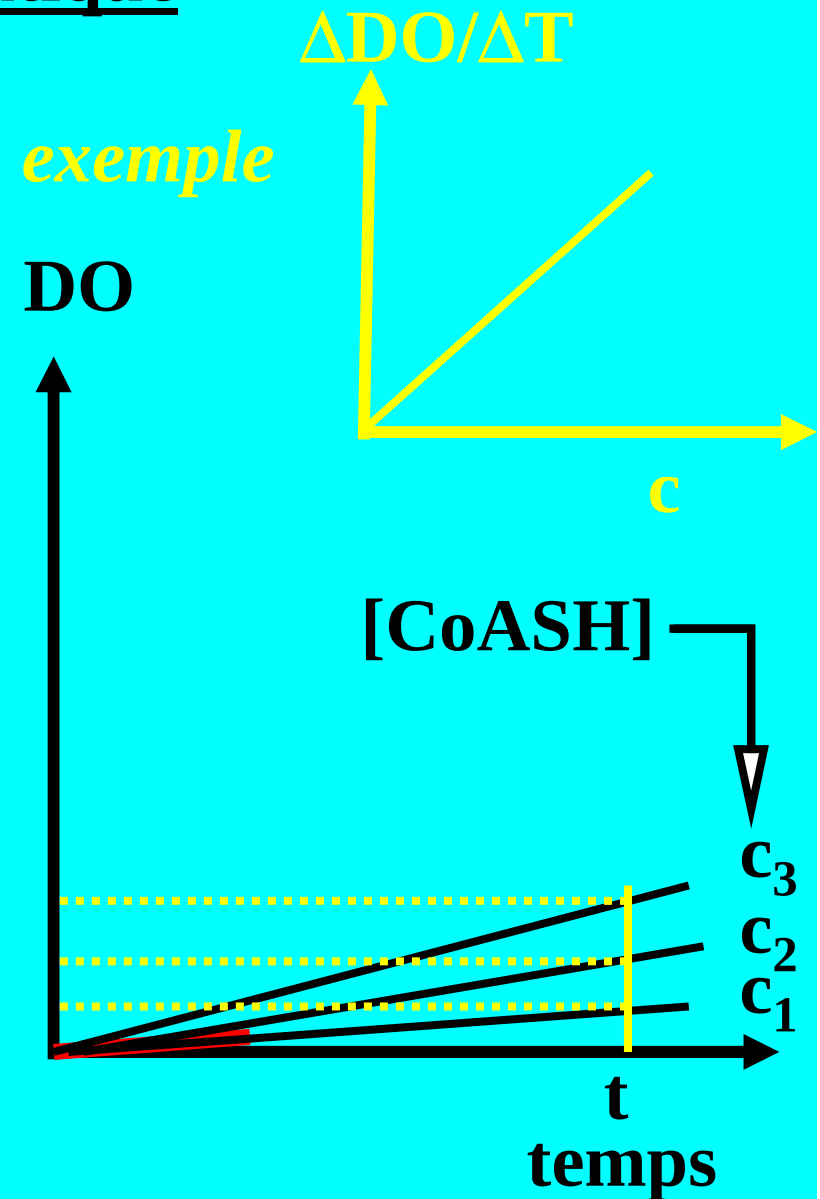
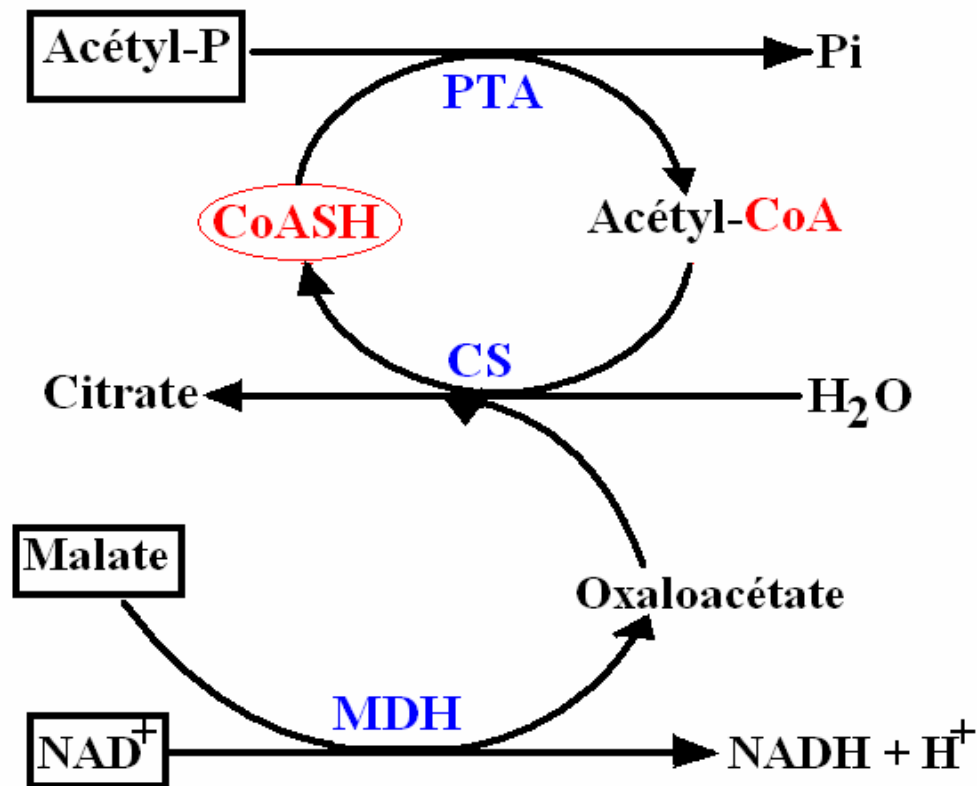
3) à calculer la vitesse de la réaction après un délai suffisamment long pour que la variation de l'indicateur soit sensible.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

b. Méthode cinétique catalytique ; exemple

Dosage du CoASH par la méthode catalytique



V. DOSAGES ENZYMATIQUES

2. Les méthodes de dosage enzymatique

- *Une réaction indicatrice intéressante*

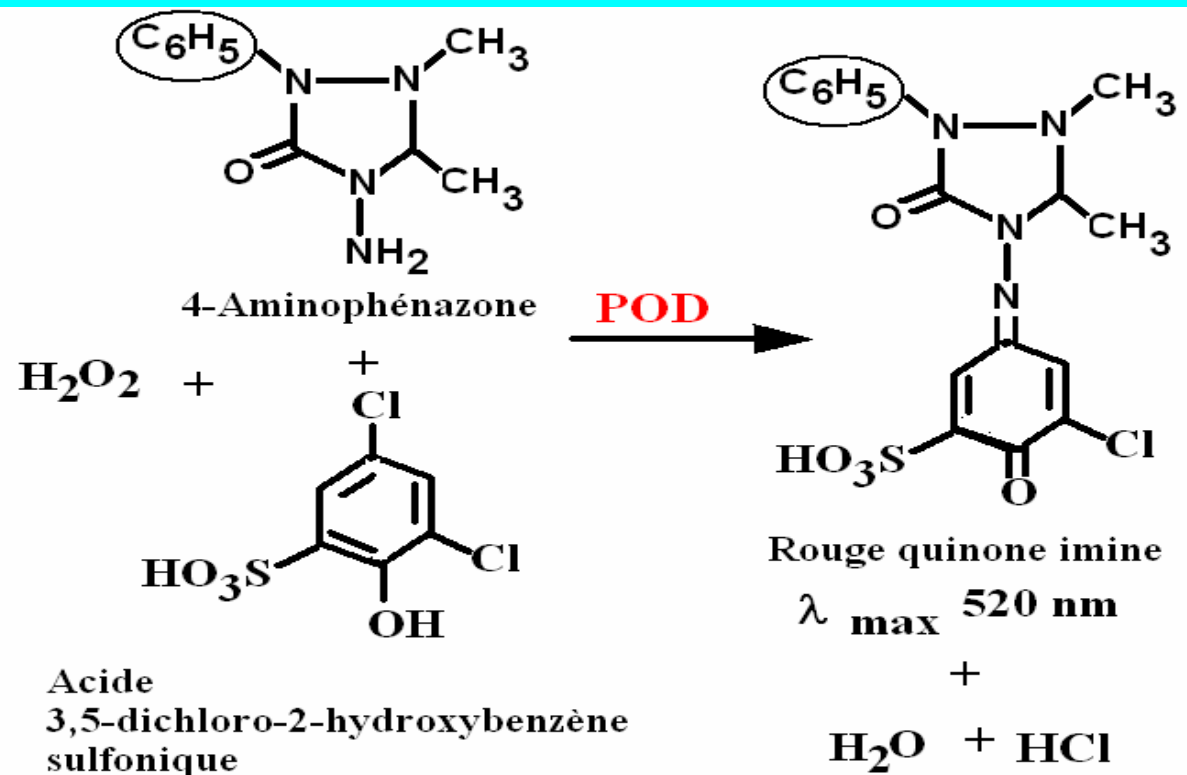
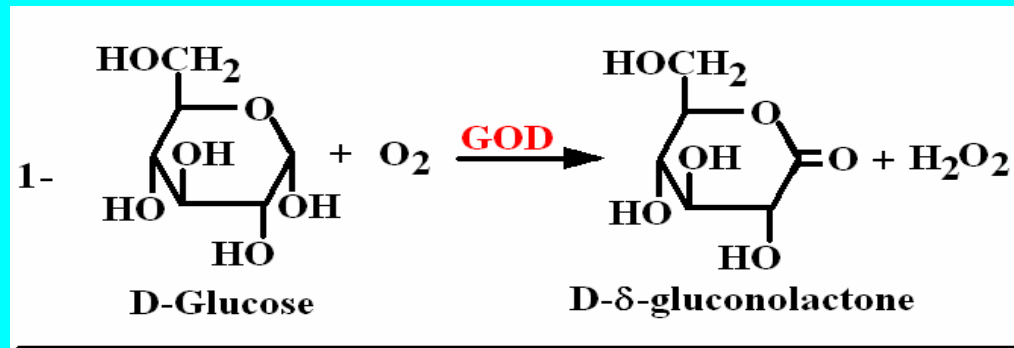
Plusieurs intermédiaires métaboliques, glucose, cholestérol, etc....peuvent être oxydés par l'action d'oxydases spécifiques en donnant des réactions de type :



On peut coupler à ces réactions une réaction **indicatrice à la peroxydase** qui peut libérer un composé coloré qu'on peut déterminer par simple colorimétrie.

V. DOSAGES ENZYMATIQUES

- Une réaction
indicateur
intéressante



Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

