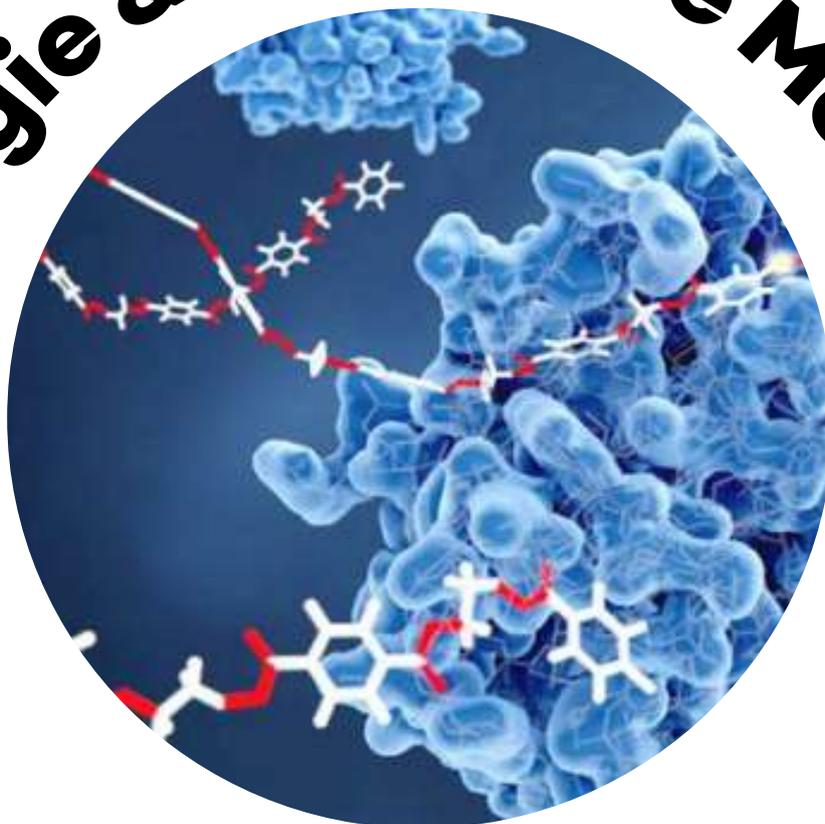


Enzymologie & Biochimie Métabolique



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

Eléments de BIOCHIMIE

Notions d'enzymologie

Hubert Becker
IBMC, Laboratoire 337, 3^{ème} étage
h.becker@ibmc.u-strasbg.fr

<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/enseignement/Hubert.html>

I. Introduction

1. Caractéristiques des enzymes

Toutes les enzymes sont des protéines (presque toutes.....ribozymes)

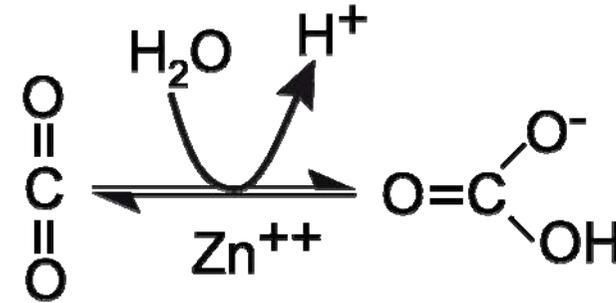
- Les protéines enzymatiques sont des catalyseurs: concentrations très petites augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat.
- A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.
- Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction: elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux.

<http://www.brenda.uni-koeln.de/>

I. Introduction

1. Caractéristiques des enzymes

L'anhydrase carbonique (une chaîne de 264 acides aminés; 29000 daltons), catalyse la réaction d'addition d'une molécule d'eau sur une molécule de gaz carbonique pour donner l'acide carbonique qui se dissocie au pH physiologique en un ion bicarbonate et un proton. Cette réaction est réversible et aboutit à un état d'équilibre.



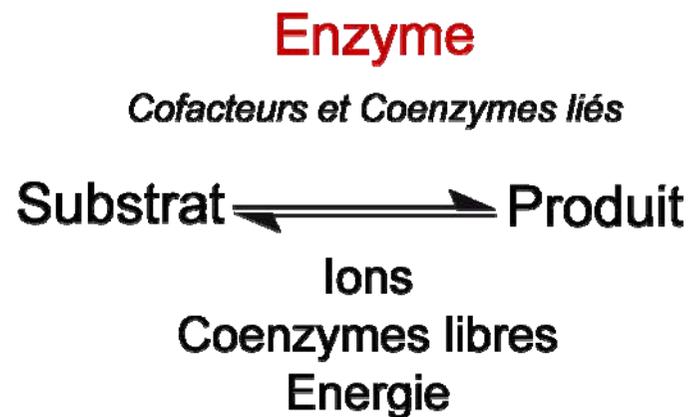
Gaz carbonique

Bicarbonate

La présence d'un atome de Zinc est nécessaire à son activité= cofacteur

I. Introduction

2. La réaction enzymatique



- Les cofacteurs sont des atomes ou des molécules qui interviennent dans la réaction enzymatique, mais ne sont pas transformés définitivement à la fin de cette réaction.

Ils interviennent:

- transport du substrat
- réception du produit
- participation à la structure de l'enzyme.

- La protéine enzymatique reconnaît spécifiquement les cofacteurs dont elle a besoin.

I. Introduction

2. La réaction enzymatique

- **Ligand**

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine.

- Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligands
- Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

- **Cofacteur**

Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique.

- Les cofacteurs peuvent être:
 - des ions
 - petites molécules minérales (eau, etc)
- Certains cofacteurs sont des molécules complexes synthétisées par la cellule : **coenzymes**

I. Introduction

2. La réaction enzymatique

- **Coenzyme**
Les coenzymes sont **indispensables** à la catalyse enzymatique.
- Les coenzymes sont des molécules biologiques.
- Lorsque cette molécule n'est pas synthétisée par l'organisme, tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté par l'alimentation = **vitamine**.
- **Coenzymes libres**: se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée. Ils sont **liés à l'enzyme** par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée
→ la concentration des coenzymes est du même ordre de grandeur que celle du substrat = **stoechiométrie**

I. Introduction

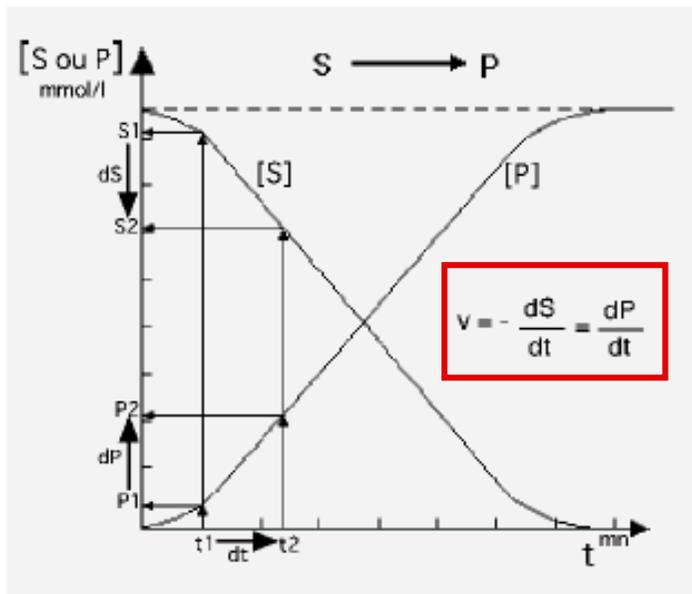
2. La réaction enzymatique

- **coenzymes liés:** ne se dissocient pas de l'enzyme. coenzymes liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalente → leur concentration est la même que celle de l'enzyme: très faible (catalytique)

II. Cinétique

3. Effet de la concentration de l'enzyme

a. Vitesse de la réaction



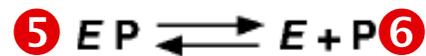
- **Activité d'une réaction enzymatique** (un substrat et un produit)
Dans un milieu défini, on observe les concentrations du substrat ou du produit, qui sont des fonctions du temps écoulé : la concentration du substrat décroît au cours du temps, celle du produit croît au cours du temps.

- **Vitesse de la réaction = rapport moins dS sur dt, qui est égal au rapport dP sur dt.** La vitesse de réaction représente le **nombre de moles de substrat transformées** en moles de produit, dans un **volume** donné et dans un temps donné

II. Cinétique

3. Effet de la concentration de l'enzyme

b. Phases de la réaction

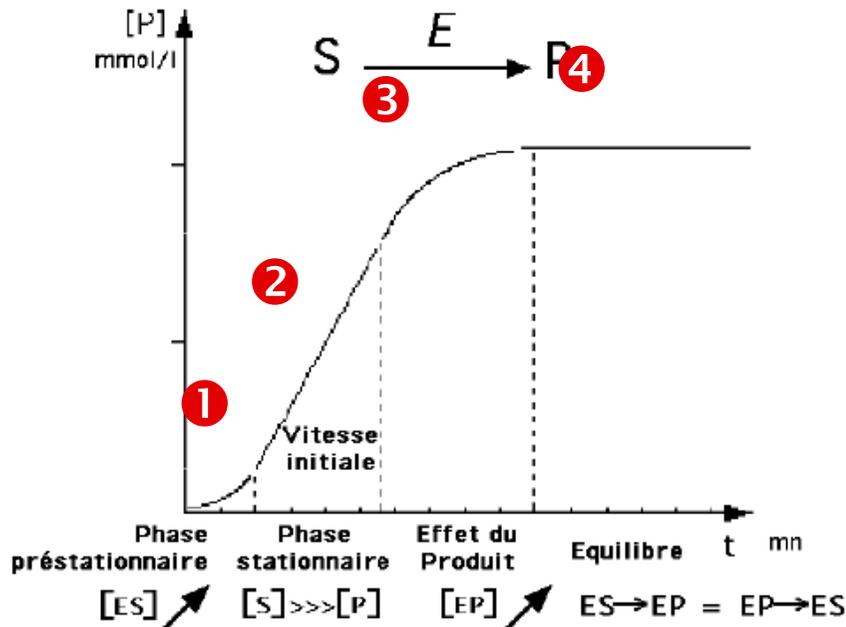


- Chaque molécule d'enzyme va se lier à une molécule de substrat. Ce **complexe ES** peut se re-dissocier.
- L'effet catalytique de l'enzyme transforme alors le complexe enzyme-substrat en complexe enzyme-produit **EP**
- Dans un dernier temps, le complexe enzyme-produit peut se dissocier (**E+P**).

II. Cinétique

3. Effet de la concentration de l'enzyme

b. Phases de la réaction



- Au temps 0 (que des molécules de l'enzyme et du substrat) \Rightarrow la réaction est non uniforme.
- première phase *très brève* ❶: la vitesse de la réaction est croissante. Durant cette phase, les molécules de substrat (S) se lient avec l'enzyme (E) la concentration du complexe enzyme-substrat [ES] augmente.
- Lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules du substrat (ES) la vitesse de la réaction est maximum et reste constante tant que la concentration du substrat est grande et celle du produit petite ❷.
- Lorsque la concentration du produit augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle qu'on mesurait : la vitesse diminue ❸.
- Dernière phase *tardive*: la vitesse de la transformation inverse devient égale à celle de départ : les concentrations ne changent plus = équilibre ❹.

II. Cinétique

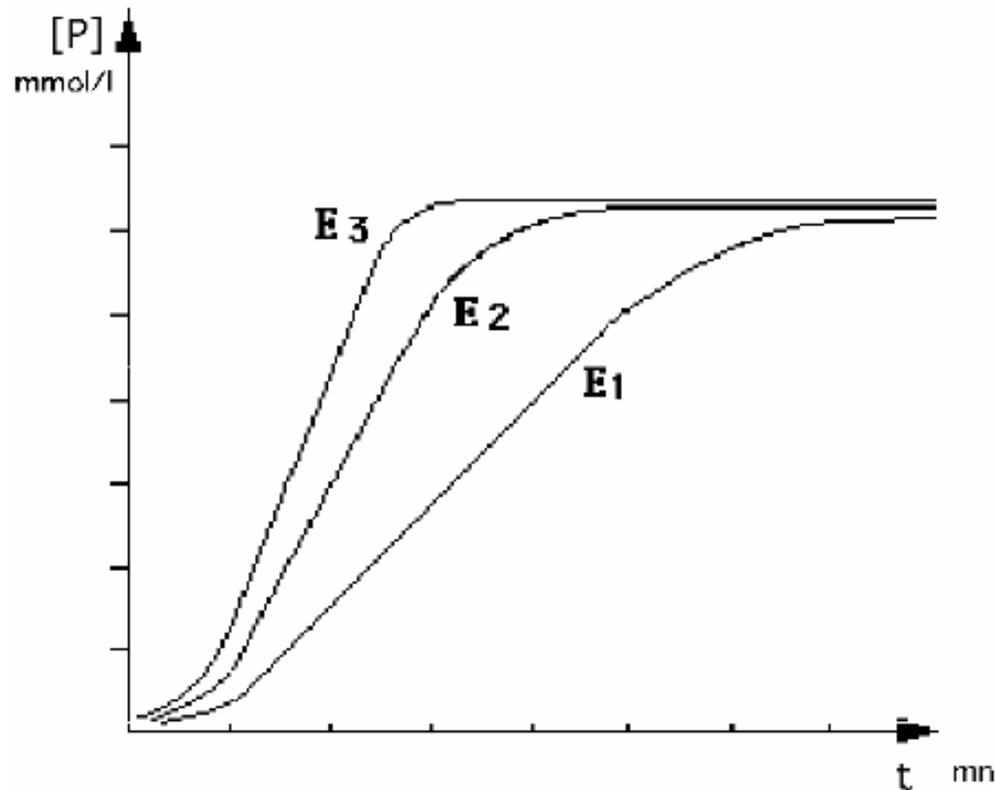
3. Effet de la concentration de l'enzyme

c. Vitesse initiale

- Durant la phase stationnaire ②, la vitesse est constante : vitesse initiale.
- C'est une phase de la réaction où un nombre maximum des molécules de l'enzyme sont liées à des molécules de substrat: Le rapport enzyme lié sur enzyme total est maximum.
- Dans ces conditions, l'efficacité catalytique de l'enzyme est la plus grande \Rightarrow la vitesse initiale est la plus grande de toutes les vitesses qu'on peut mesurer en fonction des phases de la réaction.

II. Cinétique

3. Effet de la concentration de l'enzyme d. Concentration de l'enzyme



- Lorsque la concentration de l'enzyme est grande [E₃] la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration de l'enzyme est petite [E₁].
- **L'augmentation de la concentration de l'enzyme** ⇒ augmentation de la V_i
- Lorsqu'une enzyme existe à la fois sous une forme active/forme inactive: la **concentration efficace** de l'enzyme est celle de la forme active seule.
- **Les modifications de la structure** (postérieures à la synthèse de l'enzyme): passage de l'enzyme de la forme inactive à la forme active ⇒ augmentation de la concentration efficace de l'enzyme et donc la **vitesse** de la réaction

II. Cinétique

3. Effet de la concentration de l'enzyme

Ces modifications peuvent être:

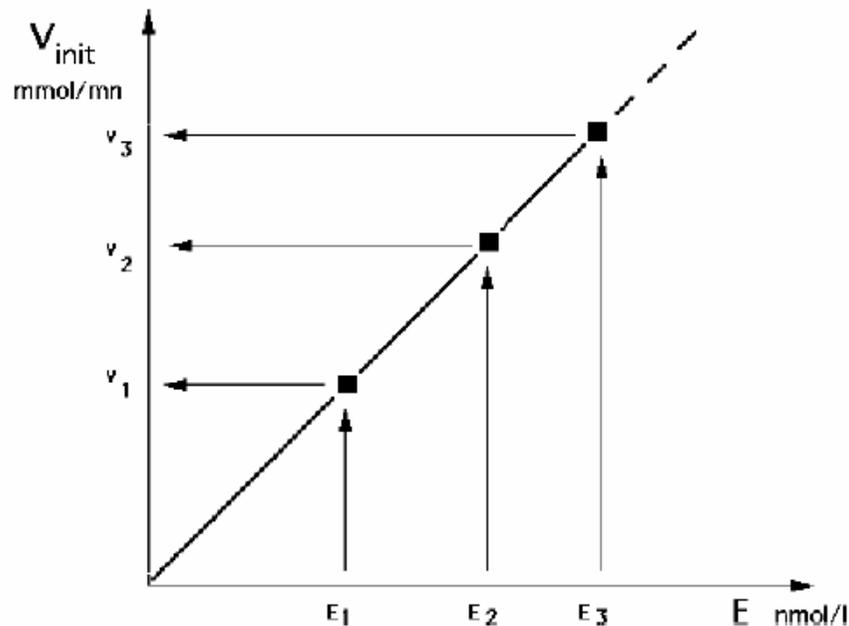
- **Hydrolyse (Protéolyse)** d'un fragment de la chaîne d'acides aminés: activation des zymogènes en enzymes actives au cours de la digestion, activation des facteurs de la coagulation du sang.
- **Phosphorylation, déphosphorylation** (Sérine Thréonine, Tyrosine) : des enzymes pour augmenter le taux de glucose dans le sang, déphosphorylation des enzymes pour diminuer le taux de glucose dans le sang
- **Liaison avec un cofacteur ou un coenzyme lié** = groupement prosthétique :
Ion métallique: Zinc sur les déshydrogénases à NAD Flavine: flavoprotéines
Hème: cytochromes
- **Acylation, alkylation**: Myristyl, Géranyl, Farnésyl: transfert de radicaux Acyl- ou Alkyl- sur des acides aminés de l'enzyme.

II. Cinétique

3. Effet de la concentration de l'enzyme

e. Dosage enzymatique

Vitesses initiales en fonction des concentrations E_1 , E_2 et E_3 de l'enzyme



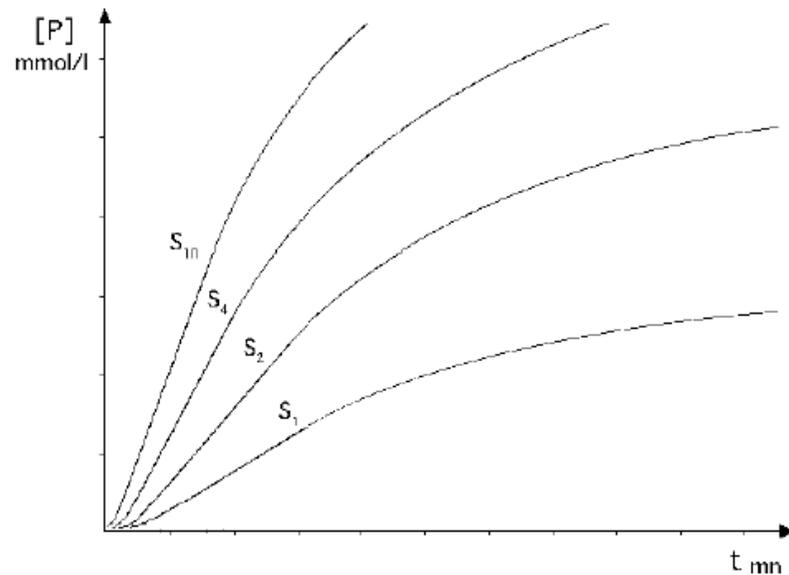
- Les vitesses mesurées (V_i) sont linéairement proportionnelles aux concentrations de l'enzyme utilisées.
- **Dosage enzymatique** : la vitesse initiale d'une réaction enzymatique dans un milieu où la concentration de l'enzyme est inconnue est proportionnelle à cette concentration. En comparant cette vitesse initiale (appelée dosage enzymatique) à celles d'autres milieux de concentration en enzyme connues, on peut évaluer la concentration en enzyme.
- Ces dosages enzymatiques sont des **mesures d'activités catalytiques**
- Activité enzymatique exprimée en **Katal** (SI): unité qui représente une quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation **d'une mole de substrat en une seconde**.

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

a. Concentration de substrat

Evolution de la réaction en fonction de la concentration en substrat.



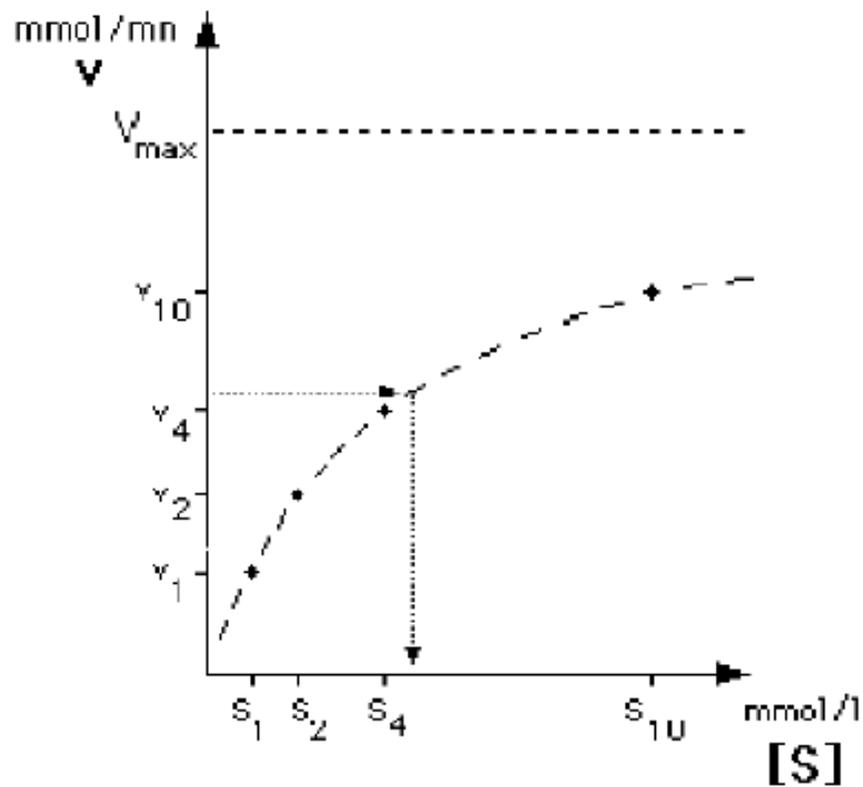
- La concentration du produit en fonction du temps est différente pour chacune des concentrations de substrat
- Lorsque la concentration du substrat est grande (par exemple [S₁₀]) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite (par exemple [S₁]). ⇒ On peut mesurer ces vitesses initiales en calculant la différence de concentration de produit au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat.

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

b. Cinétique Michaélienne

Vitesses initiales en fonction des concentrations du substrat



- Les vitesses mesurées croissent en fonction des concentrations du substrat. \Rightarrow le graphe de cette fonction est une **hyperbole**.
- Lorsque la concentration du substrat est nulle la vitesse est 0, donc l'hyperbole **passé par l'origine** du graphe.
- Lorsque la concentration du substrat tend vers l'infini, l'hyperbole tend vers l'asymptote. L'asymptote correspond à la vitesse initiale qu'on observerait si la concentration du substrat était infinie (vitesse maximum possible).
- **La constante de Michaelis**: L'abscisse du point de la courbe pour lequel l'ordonnée est égale à la moitié de celle de l'asymptote = concentration de substrat pour laquelle on peut mesurer une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximum.

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

c. Vitesse maximale

- La vitesse maximale = une vitesse initiale, mais on ne peut pas l'observer puisqu'il est impossible de réaliser dans le milieu une concentration infinie de substrat.

d. Constante de Michaelis

- Concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale d'une réaction enzymatique atteint la moitié de la vitesse maximum

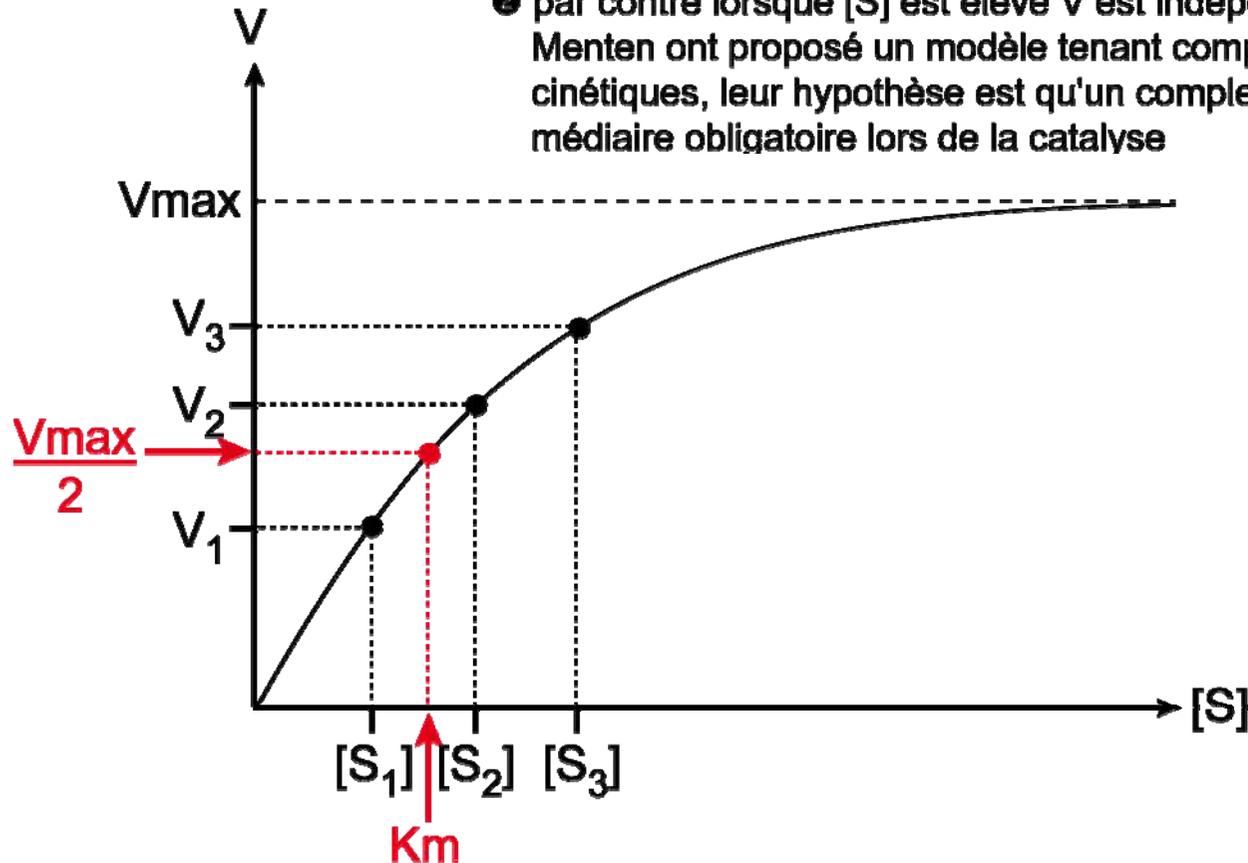
II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

e. Etablissement de l'équation de Michaelis-Menten

En se rappelant l'allure de la courbe V en ft de $[S]$ on remarque que:

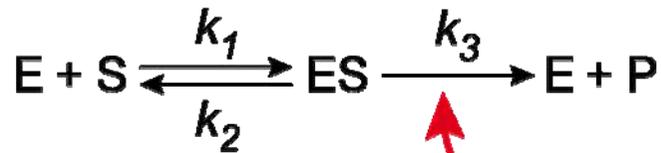
- ❶ pour une concentration fixée d'enzyme, V est linéairement proportionnelle à $[S]$ et ceci qd $[S]$ est faible.
- ❷ par contre lorsque $[S]$ est élevé V est indépendant de $[S]$. Michaelis et Menten ont proposé un modèle tenant compte de ces caractéristiques cinétiques, leur hypothèse est qu'un complexe spécifique ES est un intermédiaire obligatoire lors de la catalyse



II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

e. Etablissement de l'équation de Michaelis-Menten



Cette réaction est irréversible cad le produit P ne peut être réverté en S (ceci est valable tant que la concentration en P est faible cad au début de la réaction).

Ce que l'on veut c'est une expression qui relie la vitesse de la catalyse aux concentrations de S et de E. Le point de départ est donc:

$$V = k_3 \cdot [ES] \quad (1)$$

Ce qu'il faut trouver maintenant c'est comment exprimer [ES] en quantités connues. Or on sait que:

- Vitesse de formation de ES = $k_1 \cdot [E] \cdot [S]$ (2)

- Vitesse de disparition de ES = $k_2 \cdot [ES] + k_3 \cdot [ES] = (k_2 + k_3) \cdot [ES]$ (3)

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

e. Etablissement de l'équation de Michaelis-Menten

Nous nous intéressons à la vitesse catalytique à l'état stationnaire qui est l'état dans lequel la concentration des intermédiaires réactionnels est constante alors que celle des substrats et des produits change.

Ceci n'arrive que si les vitesses de formation de ES et de disparition de ES sont égales. D'où:

$$(2) = (3)$$

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_3) \cdot [ES] \quad (3)$$

D'où:

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E] \cdot [S]}{(k_2 + k_3)}$$

D'où:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1} \right)} \quad (4)$$

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

e. Etablissement de l'équation de Michaelis-Menten

L'équation (4) peut être simplifiée en définissant une nouvelle cte appelée K_m ou cte de Michaelis

$$K_m = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}$$

En l'introduisant dans l'équation (4) on obtient: $[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_m}$ (5)

Si maintenant on s'intéresse au numérateur de l'équation (5). La concentration de substrat non complexée à l'enzyme est quasiment égale à la concentration totale de substrat que l'on a introduit dans la réaction car la concentration d'enzyme introduite dans le mélange réactionnel est catalytique donc très inférieure à celle du substrat.

$$[E] \ll [S]$$

Et donc la concentration d'enzyme non complexée est égale à la concentration d'enzyme qu'on avait au départ moins la concentration du complexe ES

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (6)$$

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

e. Etablissement de l'équation de Michaelis-Menten

En remplaçant [E] dans l'équation (5) celle-ci devient:

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES]) \cdot [S]}{K_m}$$

D'où:

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S] - [ES] \cdot [S]}{K_m}$$

D'où:

$$K_m \cdot [ES] + [ES] \cdot [S] = [E_0] \cdot [S]$$

D'où:

$$[ES] \cdot (K_m + [S]) = [E_0] \cdot [S]$$

D'où:

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

e. Etablissement de l'équation de Michaelis-Menten

En remplaçant [ES] dans l'équation (1) celle-ci devient:

$$V = k_3 \cdot [E_0] \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

La vitesse maximale est atteinte quand toute l'enzyme est saturée avec le substrat
cad quand:

$$[S] \gg K_m$$

cad quand:

$$\frac{[S]}{K_m + [S]} \simeq \frac{[S]}{[S]} \simeq 1$$

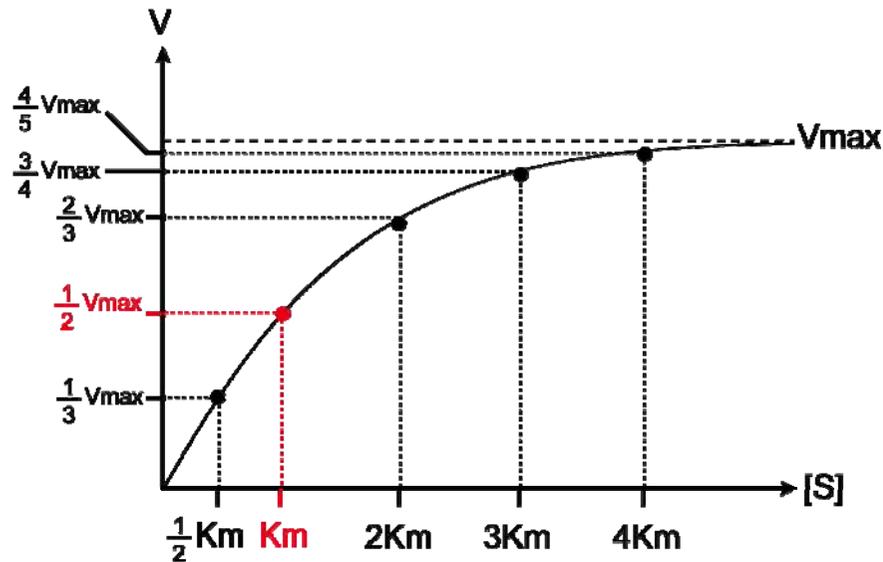
L'équation (8) devient:

$$V_{\max} = k_3 \cdot [E_0]$$

En remplaçant dans l'équation (8): $V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$ Equation de Michaelis-Menten

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat f. Hyperbole de Michaelis-Menten



- Le graphe représentant cette fonction confirme les conclusions mathématiques. Le calcul de la vitesse initiale à partir de concentrations de substrat égales à des multiples entiers de K_m aboutit à des fractions entières de la vitesse maximale.
- On trace une hyperbole à partir des points obtenus \Rightarrow paramètres géométriques K_m et V_{max} .
- V_{max} : vitesse initiale que la réaction aurait si la concentration du substrat était infinie.
- K_m : concentration du substrat pour laquelle on observe une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximale.

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

g. La représentation de Lineweaver et Burk

D'où la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{D'où: } \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

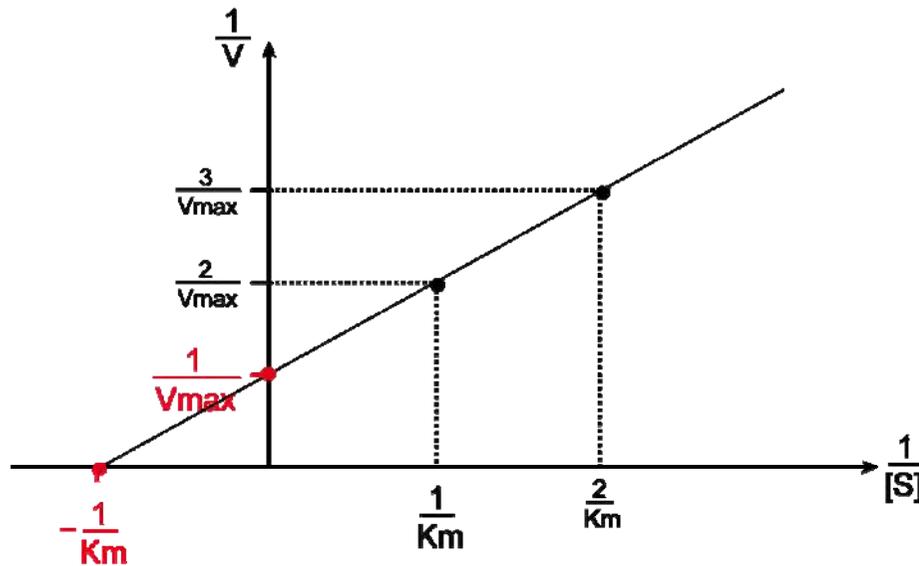
$$\text{D'où: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

$$\text{D'où: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

II. Cinétique

4. Effet de la concentration de substrat

f. La représentation de Lineweaver et Burk

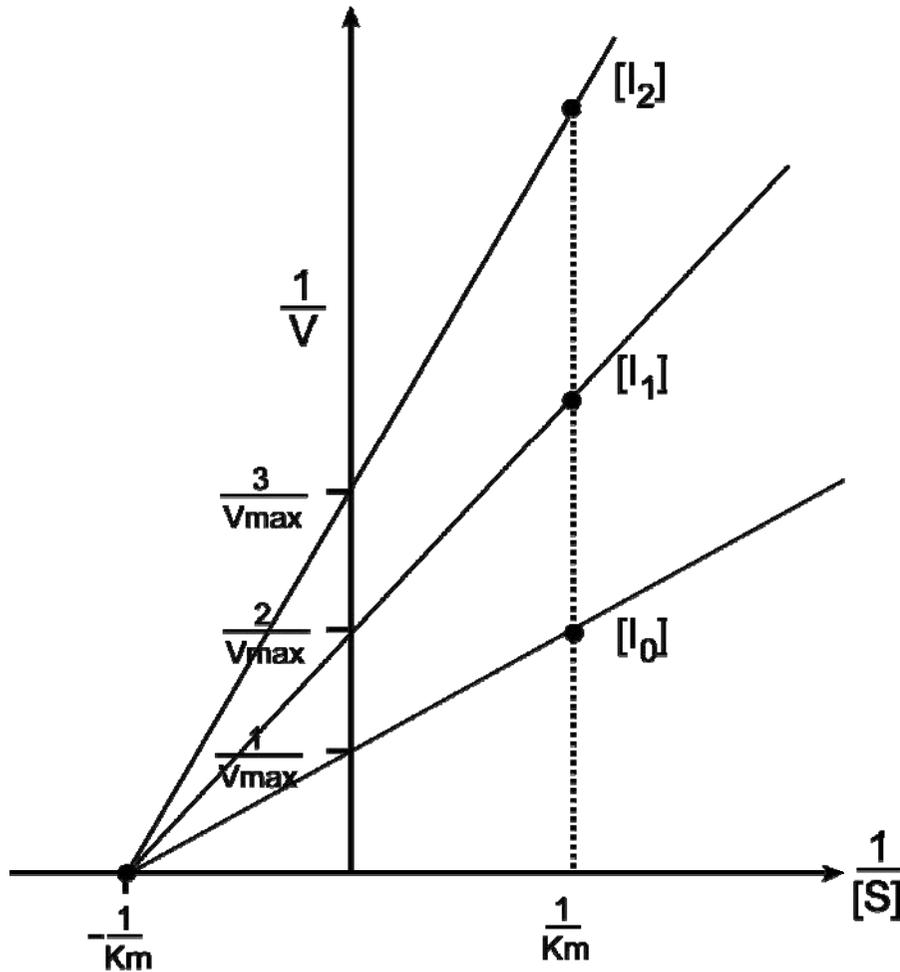


Cette extrapolation permet de déterminer graphiquement les constantes V_{max} et K_m .

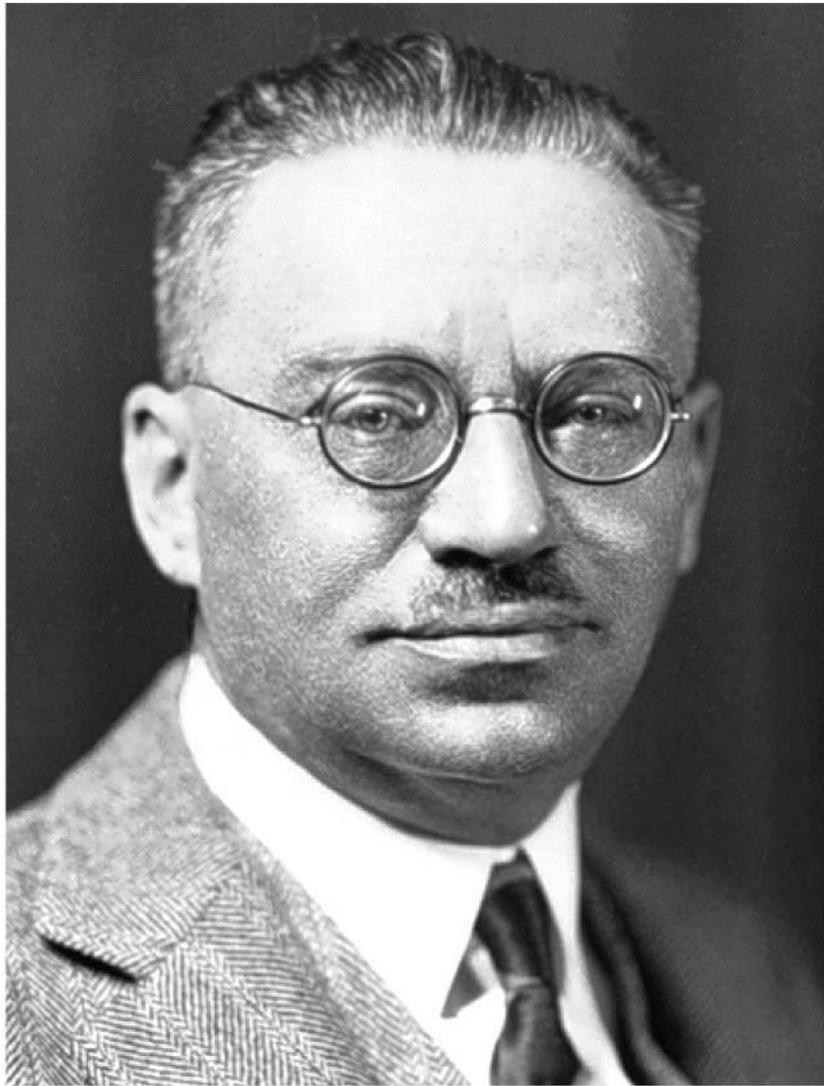
- Le graphe représentant cette fonction linéaire est appelé graphe en double inverse (les deux variables sont respectivement les inverses des variables de l'hyperbole précédente).
- Sur l'axe des x: les concentrations croissantes du substrat ont des inverses qui diminuent de sorte que: le croisement des axes représente l'inverse d'une concentration infinie du substrat, alors que la plus petite concentration voit son inverse ($2 / K_m$) repoussé à l'extrémité de l'axe.
- De même sur l'axe des y, les inverses des vitesses les plus lentes sont les plus haut situés.
- L'ordonnée à l'origine est égale à l'inverse de la vitesse maximum.
- Le double de cette ordonnée correspond à l'inverse de la moitié de la vitesse maximum et par conséquent l'abscisse du point de la droite qui a cette ordonnée est l'inverse du K_m .

II. Cinétique

5. Inhibition compétitive



- L'inverse de la vitesse maximum augmente avec la concentration de l'inhibiteur de même que la pente de la droite. Pour chacune de ces droites, le point qui a pour ordonnée le double de l'ordonnée à l'origine (losanges) correspond toujours à la même abscisse qui est l'inverse du K_m .
- Le point commun de toutes ces droites est situé à gauche de l'axe des y, dans une partie du graphe qui n'a pas de sens physique puisqu'on est au-delà d'une concentration infinie du substrat ! Mais le calcul de cette abscisse montre qu'elle est de $-1/K_m$ ce qui permet une détermination graphique facile de cette constante.
- La rencontre de toutes les droites en ce point de l'axe des x est caractéristique des graphes en double inverse en présence de différentes concentrations d'un inhibiteur non compétitif.



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

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

