



L3S5 Biochimie structurale
UE EN190

Analyse structurale et fonctionnelle des protéines

Pr. Sylvie Nessler

Mesure spectrophotométrique indirecte

Exemple: Test couplé à la LDH

REACTION PRINCIPALE :

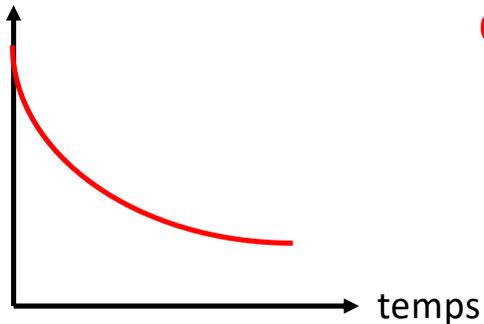


REACTION INDICATRICE :



On se place dans des conditions telles que la réaction principale soit limitante, avec $[\text{LDH}] \gg [\text{ALT}]$

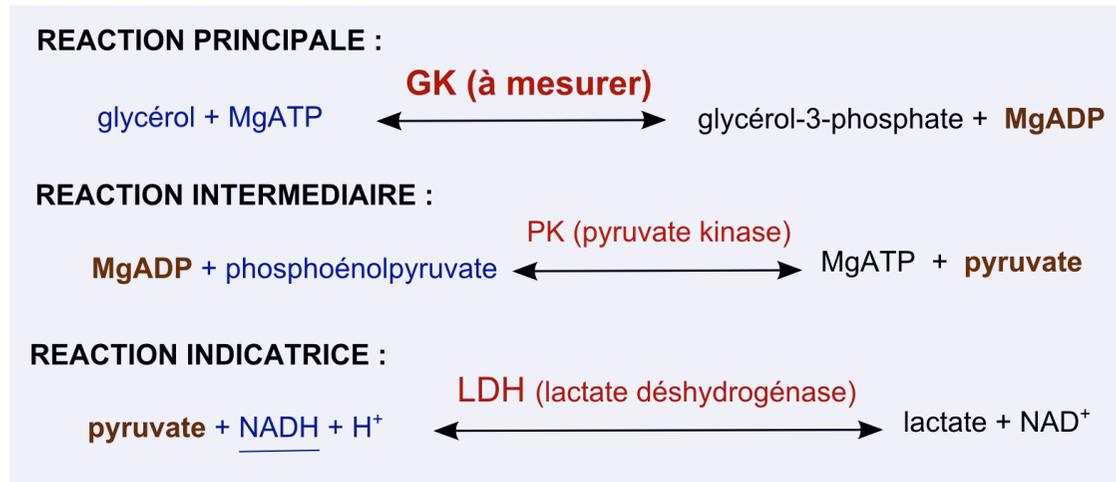
$\text{Abs}(340) = \epsilon \cdot l \cdot [\text{NADH}]$



On incube les 2 enzymes avec les substrats/co-enzymes indiqués en bleu mais c'est bien le pyruvate produit par la réaction principale qui est utilisé par la réaction indicatrice et on suit la cinétique de disparition du NADH à 340nm

Test enzymatique couplé à 2 réactions

Ex: glycérol-kinase (GK)



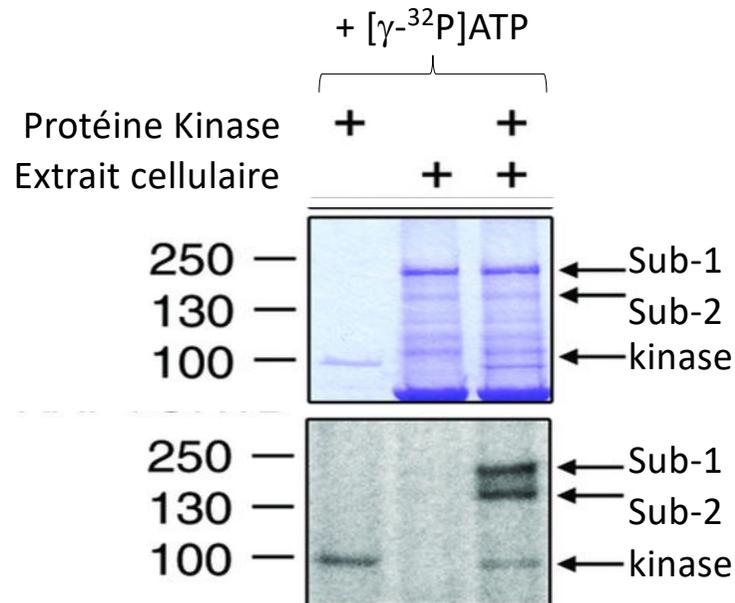
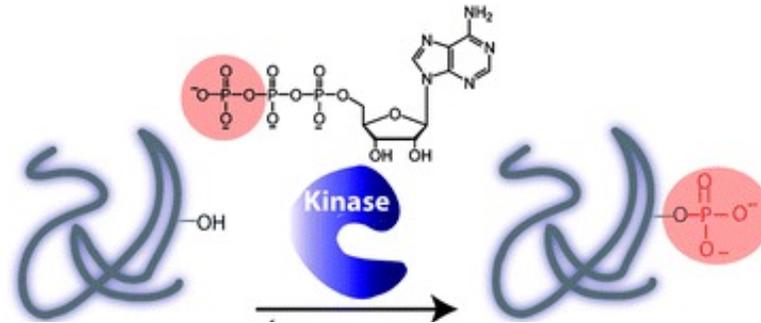
On incube les 3 enzymes avec les substrats indiqués en bleu mais c'est bien l'ADP-Mg produit par la réaction principale qui est utilisé par la réaction intermédiaire qui fournit à son tour le pyruvate nécessaire à la réaction indicatrice **et on suit la cinétique de disparition du NADH à 340nm**

En utilisant suffisamment d'activité pyruvate kinase (PK) et Lactate déshydrogénase (LDH), la vitesse de la réaction intermédiaire et de la réaction indicatrice sera limitée par la vitesse initiale de la réaction principale (celle qu'on veut mesurer). Après une phase pré-stationnaire (de courte durée), on aura un état stationnaire pour lequel

$$V_{i\text{-principale}} = V_{i\text{intermédiaire}} = V_{i\text{indicatrice}}$$

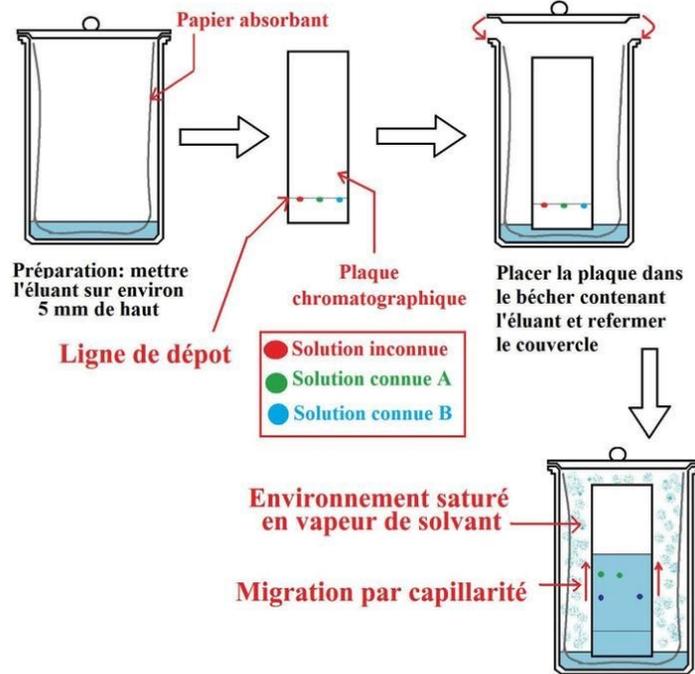
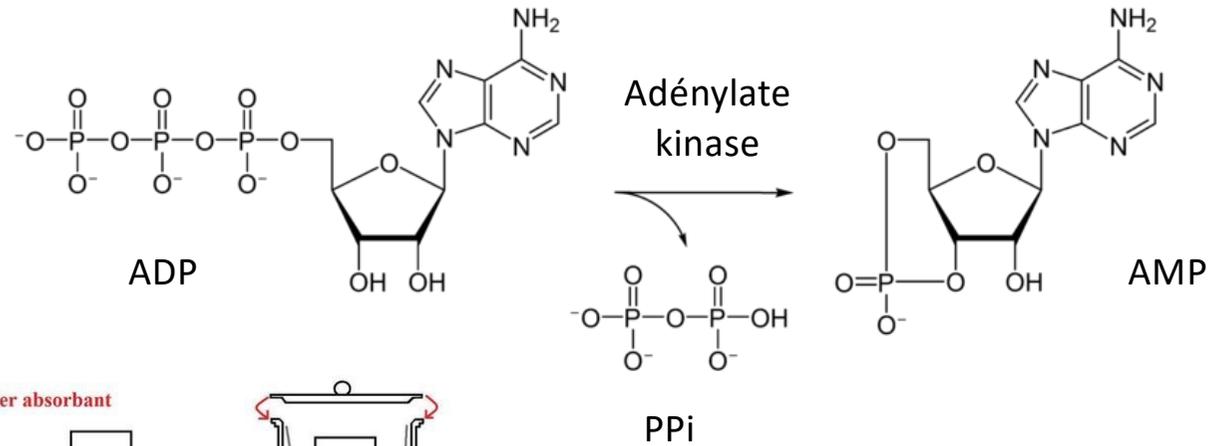
Test enzymatique par marquage radioactif

Ex: Protéine kinase: phosphorylation ATP-dépendante de Ser, Thr ou Tyr

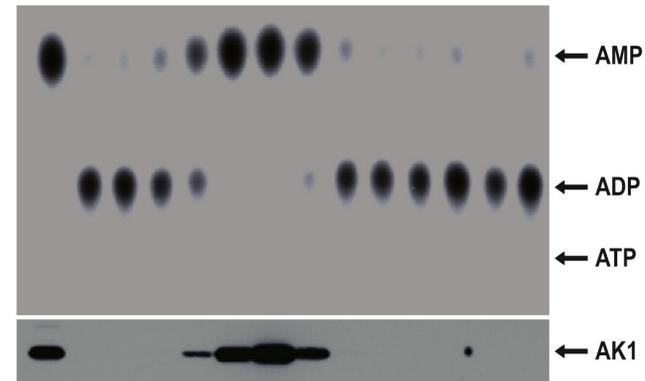


1. Incubation des échantillons
2. Dénaturation pour analyse SDS-PAGE
3. Electrophorèse
4. Coloration au bleu de Coomassie
5. Autoradiogramme

Test en chromatographie couche mince

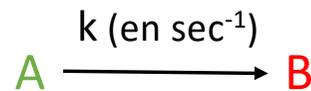


Marquage radioactif du substrat
→ autoradiogramme

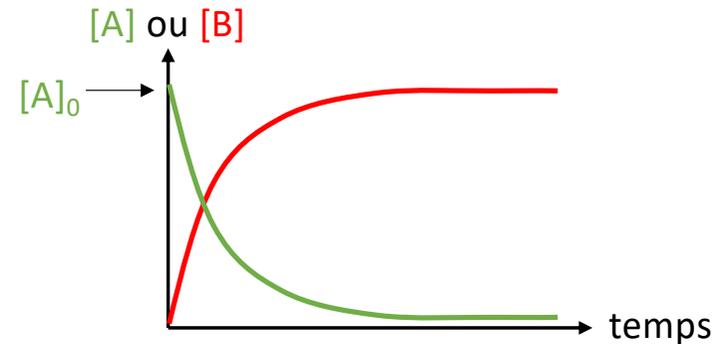


Principes de base de la cinétique enzymatique

Rappels de cinétique sans enzyme



$$V = \frac{d[B]}{dt} = \frac{-d[A]}{dt} = k [A] \quad (\text{en mole} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$$



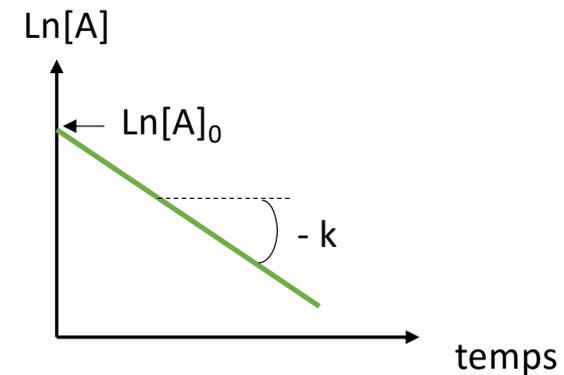
$$\rightarrow \frac{-d[A]}{[A]} = k dt \quad \text{Avec} \quad \int_0^t \frac{-d[A]}{[A]} = \text{Ln} [A]$$

$$\rightarrow -(\text{Ln}[A]_t - \text{Ln}[A]_0) = k (t-0)$$

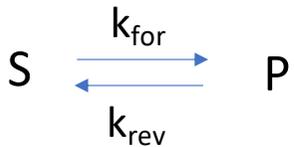
$$\rightarrow -\text{Ln}[A]_t + \text{Ln}[A]_0 = k.t$$

$$\rightarrow \text{Ln} [A]_t = \text{Ln}[A]_0 - k.t$$

$$\text{Ln}[A] = f(t) \text{ droite } y = a.x + b$$



Variation de la vitesse de réaction

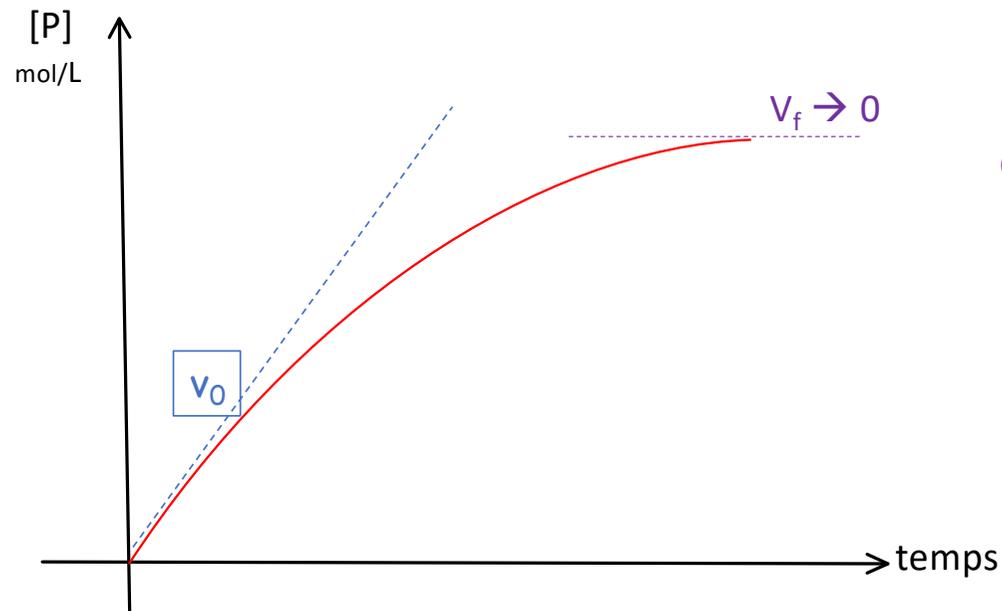


Si on peut suivre l'apparition de [P] au cours du temps alors on peut calculer la vitesse de réaction

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_{\text{for}} [S] - k_{\text{rev}} [P]$$

avec k_{for} et k_{rev} constantes cinétiques en sec^{-1}

En début de réaction, quand [P] est négligeable, $[S]_0 = [S] + [P] \approx [S]$ et la cinétique est linéaire → l'équation de vitesse se simplifie en $V_i = k_{\text{for}} [S]_0$



En fin de réaction la vitesse de réaction tend vers zéro et un équilibre se crée:

$$k_{\text{for}} [S]_{\text{eq}} = k_{\text{rev}} [P]_{\text{eq}}$$

$$\rightarrow K_{\text{eq}} = k_{\text{for}} / k_{\text{rev}} = [P]_{\text{eq}} / [S]_{\text{eq}}$$

Constante d'équilibre

Effet de l'augmentation de la quantité de substrat

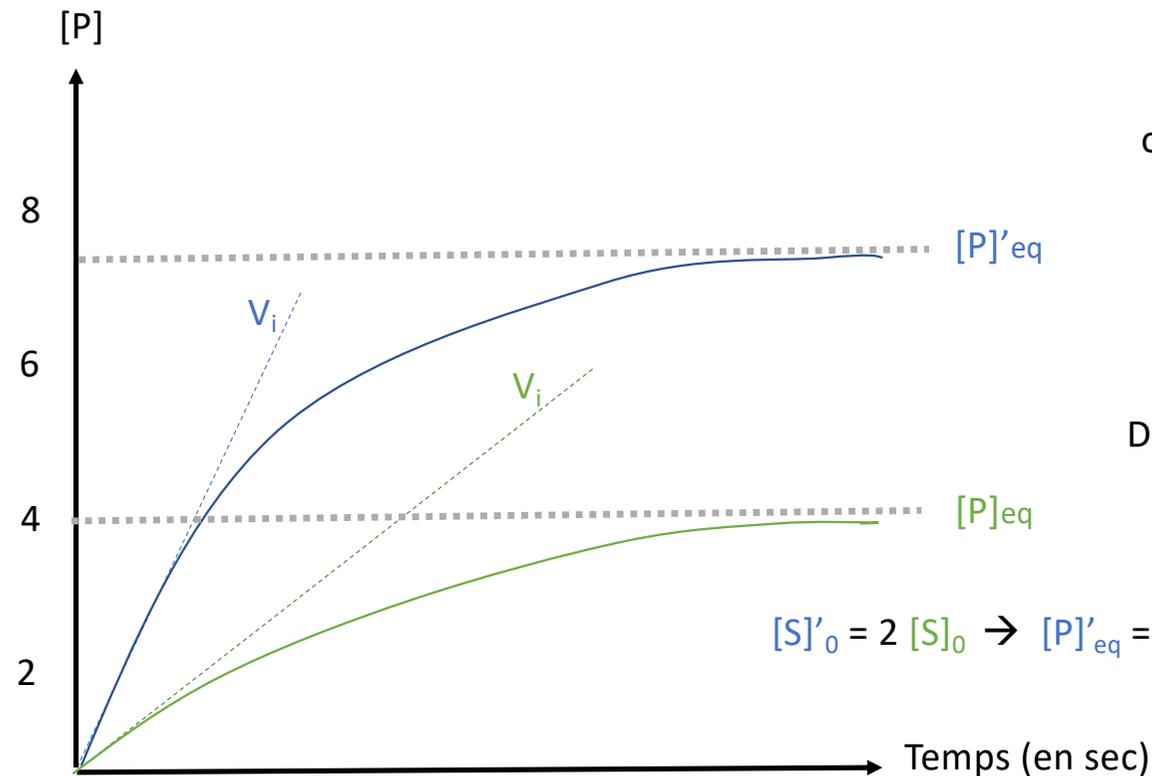
Si on augmente la concentration initiale de substrat $[S]_0$,
la hauteur du plateau à l'équilibre va elle aussi augmenter
puisque $[S]_0 = [S]_{eq} + [P]_{eq}$

or comme $[P]_{eq} / [S]_{eq} = K_{eq} = \text{constante d'équilibre}$

alors

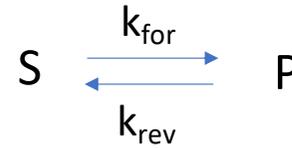
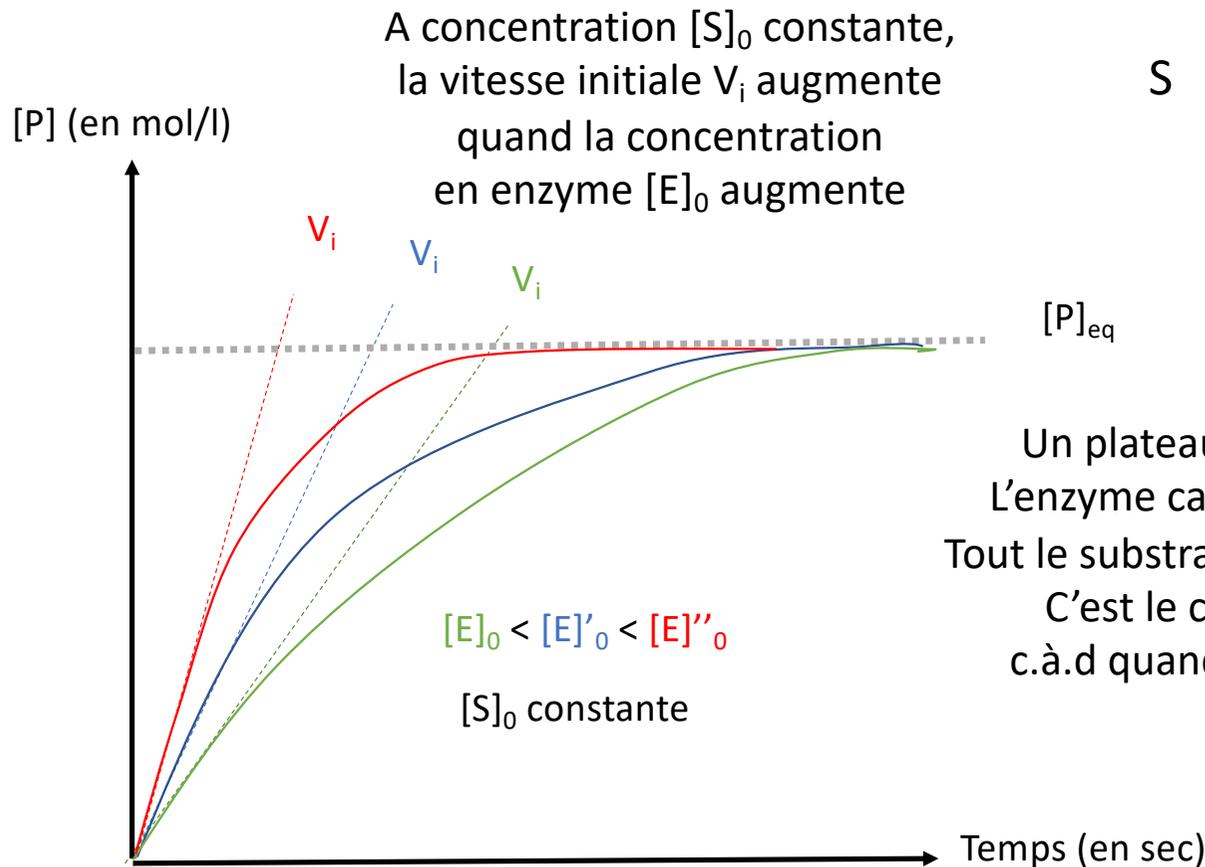
$$[P]_{eq} / [S]_{eq} = [P]'_{eq} / [S]'_{eq} = K_{eq}$$

Donc si $[S]_0$ augmente, alors $[P]_{eq}$ augmente d'autant



$$[S]'_0 = 2 [S]_0 \rightarrow [P]'_{eq} = 2 [P]_{eq}$$

Effet de l'ajout d'un enzyme



L'enzyme accélère la réaction mais ne change pas l'équilibre

$$k_{\text{for}} [S]_{\text{eq}} = k_{\text{rev}} [P]_{\text{eq}}$$

Un plateau est atteint quand la réaction est à l'équilibre. L'enzyme catalyse alors en même temps la réaction réverse. Tout le substrat n'est donc pas forcément transformé en produit.

C'est le cas seulement si la réaction est très déplacée, c.à.d quand l'enzyme catalyse très mal la réaction réverse

$$\text{avec } k_{\text{for}} \gg \gg k_{\text{rev}} \rightarrow [P]_{\text{eq}} \gg \gg [S]_{\text{eq}} \\ \text{et donc quand } K_{\text{eq}} \text{ très grand}$$

Michaelis et Menten

En 1912, Leonor Michaelis et Maud Menten ont publié leurs travaux fondamentaux sur les enzymes. Leurs recherches ont jeté une lumière nouvelle sur ces protéines qui rendent possibles les réactions chimiques de la vie.



Leonor Michaelis (1875-1949)



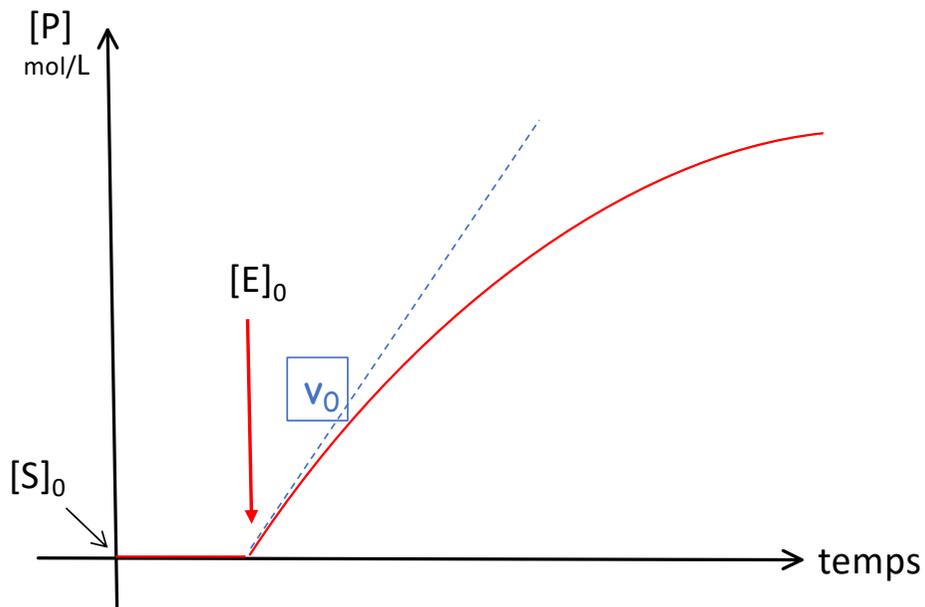
Maud Menten (1879-1960)

Cinétique enzymatique

Cas d'un schéma réactionnel simple dit de Michaelis-Menten



$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] - k_{-2} [E][P]$$



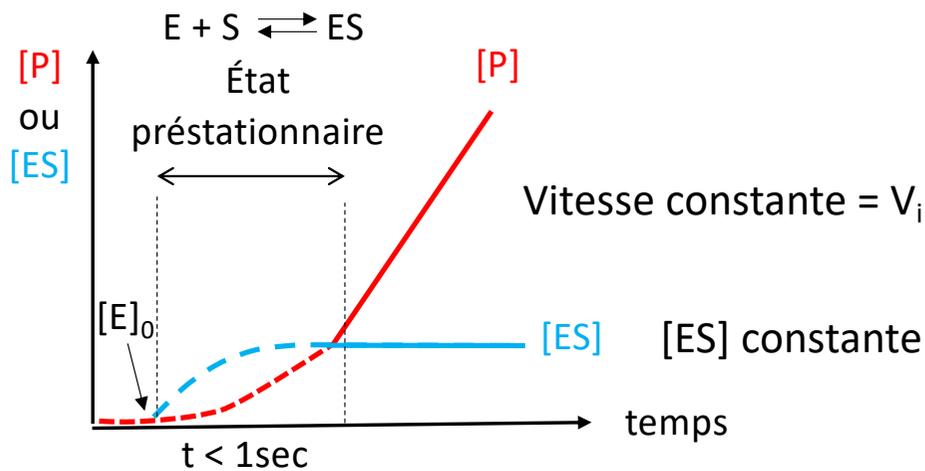
Vérifier qu'il n'y a pas transformation spontanée du substrat en produit

En début de réaction, quand $[P]$ est très faible et la réaction réverse en k_{-2} négligeable, alors la cinétique est linéaire et la vitesse constante.
→ L'équation de vitesse se simplifie en

$$V_i = k_2 [ES] = k_{\text{cat}} [ES]$$

On définit la constante catalytique k_{cat} par $V_i = k_{\text{cat}} [ES]$ et dans ce schéma simple $k_{\text{cat}} = k_2$ (en sec⁻¹)

Définition de l'état stationnaire



$[ES]$ constante \leftrightarrow état stationnaire $\leftrightarrow \frac{d[ES]}{dt} = 0$

\leftrightarrow Vitesse d'apparition = Vitesse de disparition

$\leftrightarrow k_1 [E] [S] + k_{-2} (E) [P] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$

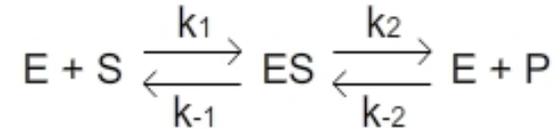
$\leftrightarrow k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$ car $[P] \approx 0$

On définit alors $K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

la constante de Michaelis-Menten (en mole . L⁻¹)

Equation de Michaelis - Menten

Cas simple d'une enzyme suivant un schéma réactionnel de type Michaelien:



On a : $V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$ et en début de réaction, quand [P] est négligeable $V_i = k_2 [ES]$

avec l'état stationnaire rapidement atteint :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

Conservation de la matière :

$$[E]_0 = [E] + [ES] \rightarrow [E] = [E]_0 - [ES]$$

et $[S]_0 = [S] + [ES] + [P]$ conditions initiales mais si $[S]_0 \gg [E]_0$ alors $[ES] \ll [S]$ et $[S] \approx [S]_0$

$$\Leftrightarrow \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \text{ (en mole} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}$$

$$\Rightarrow \frac{([E]_0 - [ES])[S]_0}{[ES]} = K_M$$

$$\Leftrightarrow [E]_0 [S]_0 - [ES] [S]_0 = K_m [ES]$$

$$\Leftrightarrow [E]_0 [S]_0 = [ES] (K_m + [S]_0)$$

$$\Leftrightarrow \frac{[E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0} = [ES]$$

$$\Rightarrow V_i = k_2 \frac{[E]_0 [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

$$\Leftrightarrow V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

On cherche à remplacer [ES], inconnu, par ce que l'on connaît, c.à.d [E]₀ et [S]₀

à saturation, quand tout [E]₀ est sous forme complexée [ES]

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$$

Et ici $k_{\text{cat}} = k_2$ (en sec⁻¹)

Représentation graphique de l'équation de Michaelis

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$V_i = f([S]_0)$ Équation d'une hyperbole

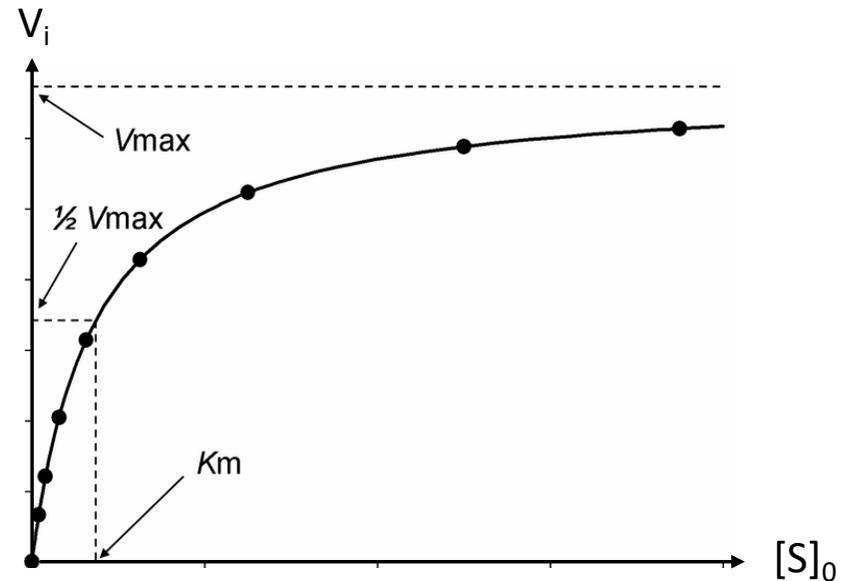
avec $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$ et $K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Si $K_M = [S]_0$

alors $V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{2 [S]_0} = \frac{V_{\max}}{2}$

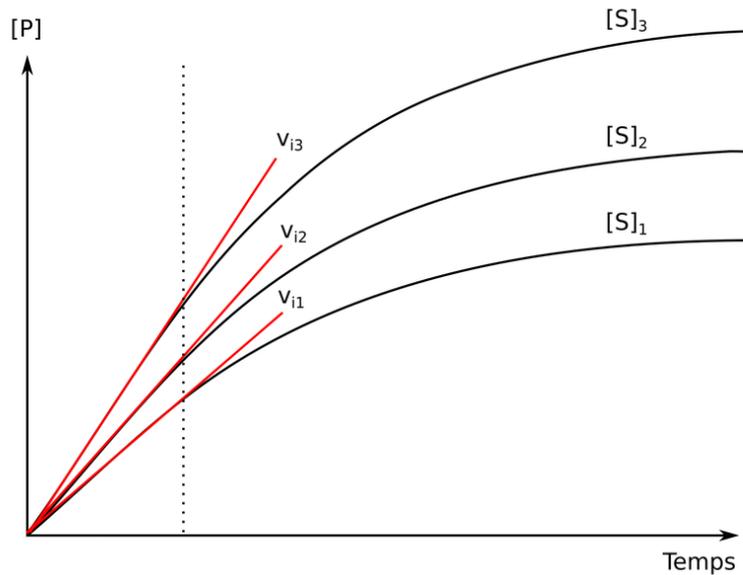
Si $K_M \ll [S]_0$

alors $V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{[S]_0} = V_{\max}$

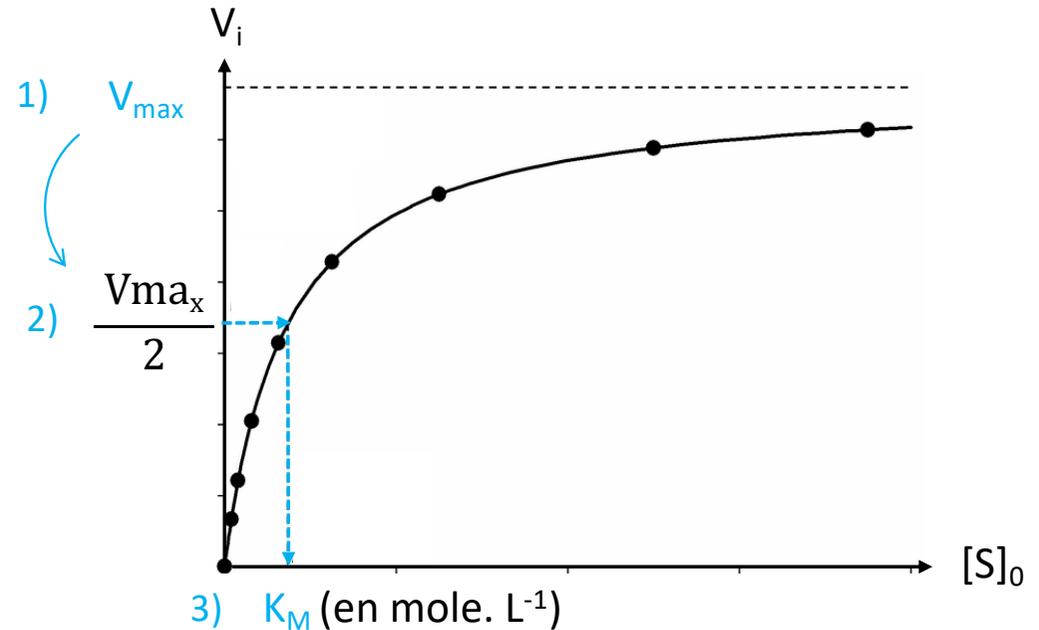


Détermination expérimentale des constantes k_{cat} et K_M

- 1) Mesurer la vitesse initiale pour plusieurs $[S]_0$ à $[E]_0$ constant et $\ll [S]_0$



- 2) Reporter chaque valeur de V_i en fonction de $[S]_0$



- 4) Et comme $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_0 \rightarrow k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_0}$ (en sec^{-1})

Notion de saturation

Si le substrat est en grand excès par rapport à l'enzyme: $[S]_0 \gg [E]_0$
Cela n'implique pas forcément que l'enzyme soit « saturé »

Exemple: si $[S]_0 = 0,1 \text{ mM}$
et $[E]_0 = 1 \text{ nM}$ (donc $[S]_0 = 100\,000 [E]_0$)

avec $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = 1 \text{ mM}$ (donc $K_M = 10 [S]_0$, non négligeable)

$$\text{alors } V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} = \frac{V_{\max} 0,1}{1 + 0,1} = \frac{V_{\max}}{11} = 0,09 V_{\max}$$

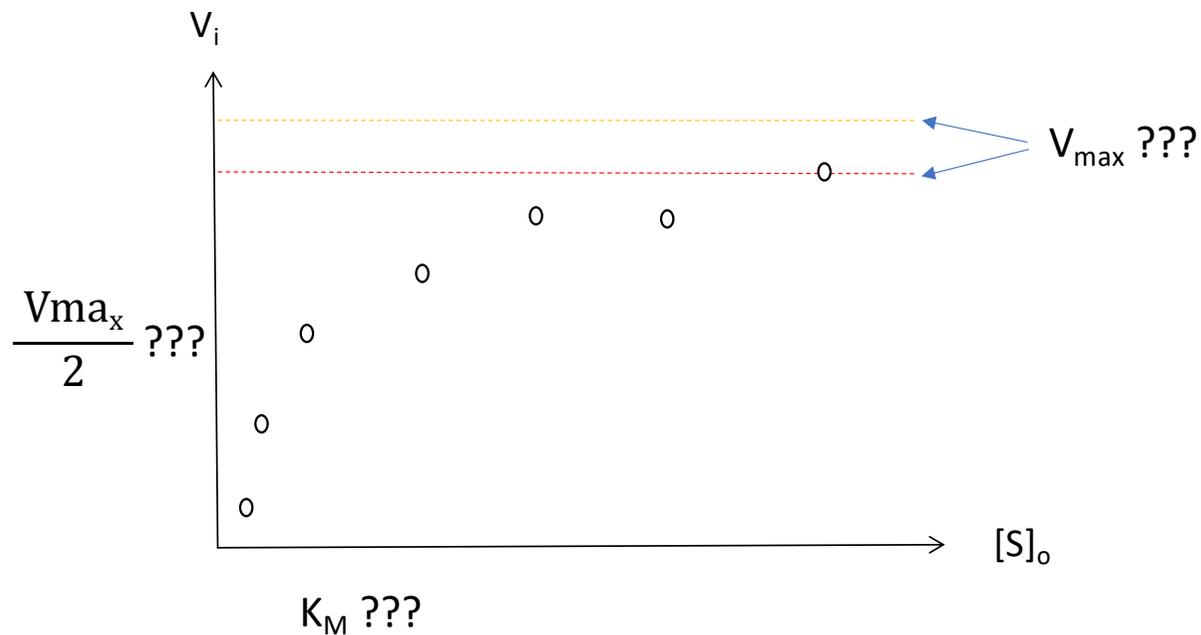
Comme $V_i = k_{\text{cat}} [ES]$ tend vers $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$ quand tout l'enzyme $[E]_0$ est sous forme ES, cela signifie que moins de 10% de $[E]_0$ est sous forme complexée.

L'enzyme est donc à plus de 90% sous forme libre.

Pour que E soit saturé (presque entièrement sous forme ES), il faut que $[S]_0 \gg K_M$

Détermination des constantes en sous-saturation

Expérimentalement, il peut être difficile d'atteindre la saturation et donc de déterminer V_{\max} par une représentation graphique directe de la courbe de Michaelis.



$$V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

Linéarisation de l'équation de Michaelis

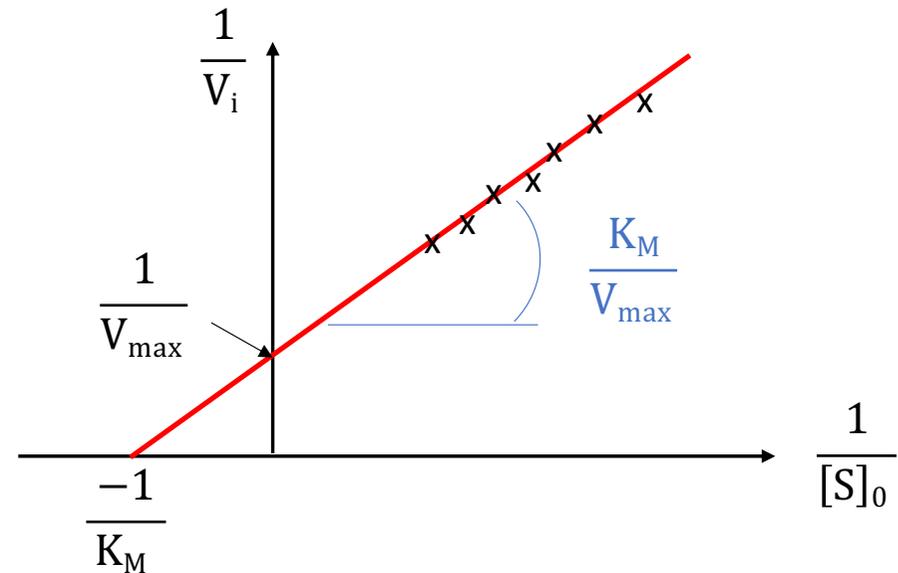
On résout ce problème en linéarisant par inversion l'équation de l'hyperbole :

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_M + [S]_0}{V_{\max} [S]_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{\max}}$$

de la forme $Y = a X + b$

- Si $\frac{1}{[S]_0} = 0 \rightarrow \frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{\max}}$
- Si $\frac{1}{V_i} = 0 \rightarrow \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]_0} = \frac{-1}{V_{\max}}$
 $\rightarrow \frac{K_M}{[S]_0} = -1$
 $\rightarrow \frac{1}{[S]_0} = \frac{-1}{K_M}$



Linéarisation : représentation de Eadie-Hofstee

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

$$\rightarrow V_i (K_M + [S]_0) = V_{\max} [S]_0$$

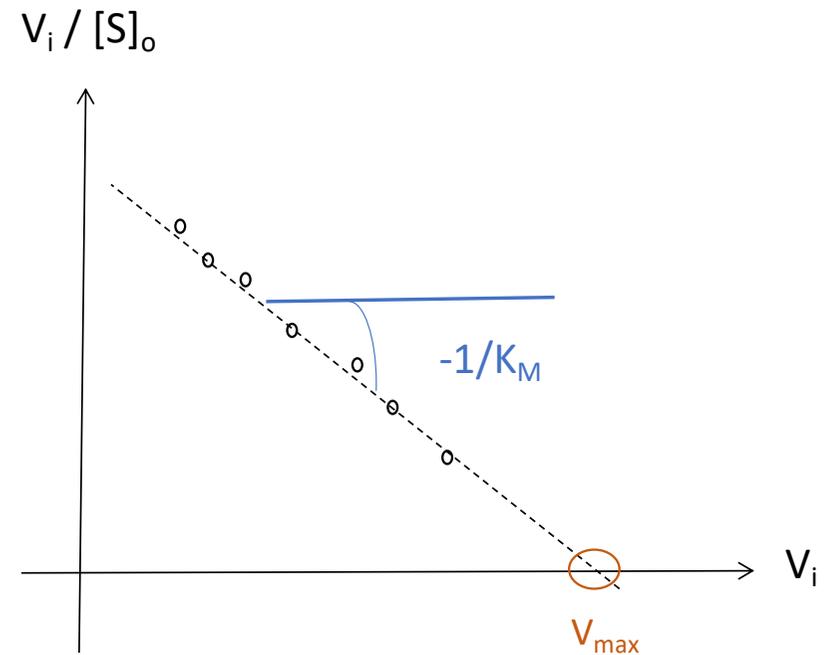
$$\rightarrow V_i K_M + V_i [S]_0 = V_{\max} [S]_0$$

$$\rightarrow \frac{V_i K_M}{[S]_0} + V_i = V_{\max}$$

$$\rightarrow \frac{V_i}{[S]_0} = \frac{V_{\max} - V_i}{K_M}$$

$$\rightarrow \frac{V_i}{[S]_0} = \frac{V_{\max}}{K_M} - \frac{1}{K_M} V_i$$

• Si $\frac{V_i}{[S]_0} = 0 \rightarrow V_i = V_{\max}$



De la forme $Y = b - a X$, droite de pente $a = -1 / K_M$

Caractérisation enzymatique

L'activité enzymatique d'une solution est
le nombre de mole de substrat qu'elle dégrade par seconde

Elle dépend de:

- la vitesse de réaction \rightarrow constante catalytique k_{cat}
-avec V_{max} la vitesse réactionnelle à saturation

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_0$$

- l'affinité de l'enzyme pour son substrat \rightarrow constante de Michaelis K_m
-Avec K_m la concentration en substrat libre à demi-saturation

$$\begin{array}{l} \text{Si } [S]=K_m \\ \rightarrow V_i = \frac{1}{2} V_{\text{max}} \end{array}$$

Pour être efficace, un enzyme doit avoir
une bonne affinité pour le substrat (faible K_M)
et une grande réactivité (k_{cat} élevé)

L'efficacité d'une enzyme est donné par le rapport k_{cat} / K_M

En comparant les valeurs de K_M et k_{cat} obtenues avec différents substrats
on peut déterminer la spécificité de l'enzyme
et identifier le(s) substrat(s) naturel(s)