

UE91 ENZYMOLOGIE

Séance 1 Rappels	(05 février 2024) JFB
Séance 2 Exercices	(26 février 2024) JFB
Séance 3 Exercices	(2 avril 2024) AB
Séance 4 Exercices	(5 avril 2024) AB

Année 2024 – 2025

Jean-François Benoist jean-francois.benoist@u-psud.fr

Arnaud Bruneel arnaud.bruneel@u-psud.fr

Rappel des formules essentielles et définitions à connaître

QCM

Enzyme : catalyseur protéique, augmente la vitesse de réaction, diminue l'énergie d'activation E_{act} nécessaire pour atteindre l'état de transition, n'est pas consommée par la réaction, ne modifie pas la constante d'équilibre.

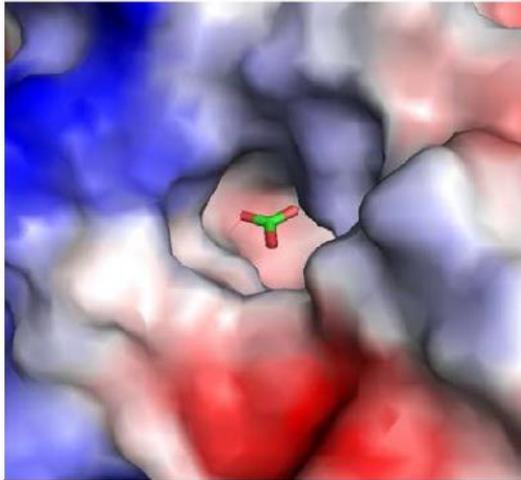
- agit à très faibles concentrations
- augmente la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat (10^3 à 10^{17} réactions par seconde)
- structure inchangée à la fin de la réaction

Anhydrase carbonique

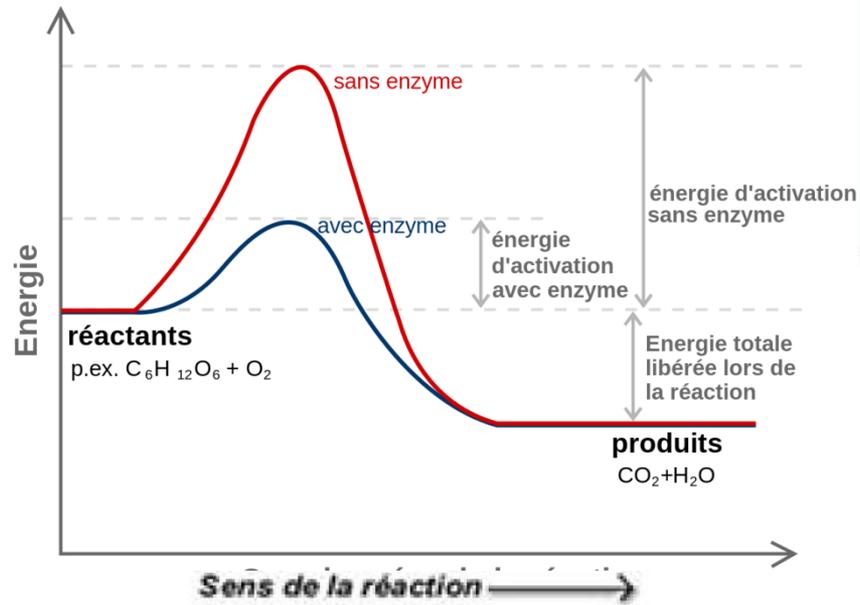


Vitesse x 5.10^6

Le substrat a besoin d'une énergie d'activation pour atteindre un état de transition instable avant la transformation en produit.



Site actif de l'anhydrase carbonique montrant la surface électrostatique. Le CO_2 une fois lié, est immédiatement transformé en HCO_3^- au fond du site actif.

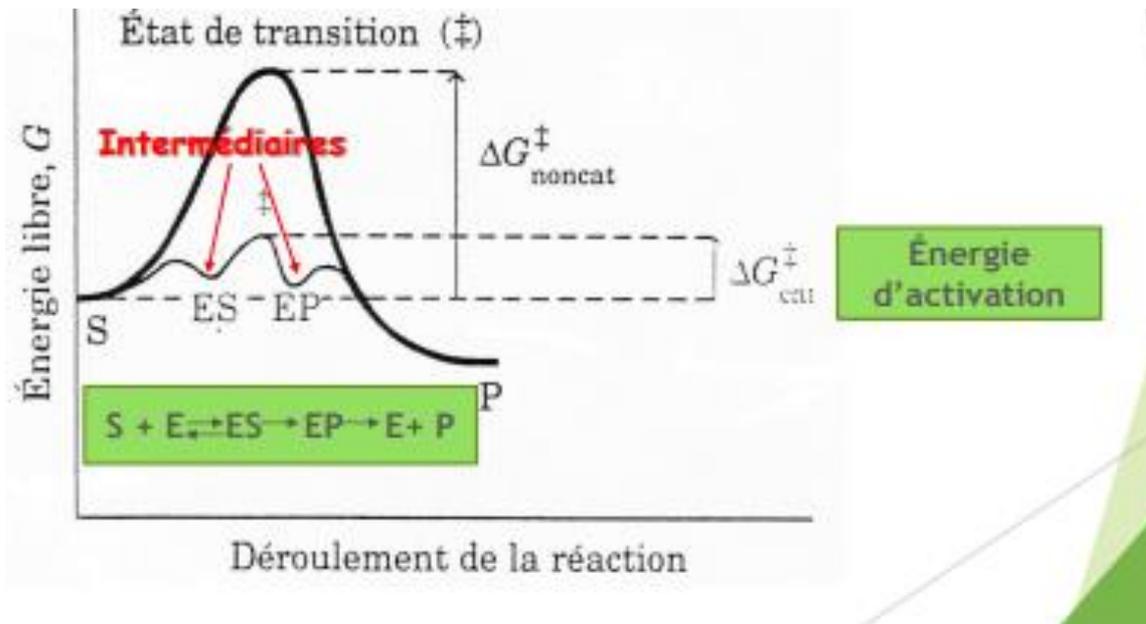


Protection contre la dégradation spontanée des molécules (ex glycogène)

Formation d'un complexe enzyme-substrat par interactions réciproque (liaisons faibles) au niveau du site actif

→ **Stabilisation de l'état de transition**

Libération du produit



LES CLASSES D'ENZYMES

QCM

Classe 1: oxydoréductases, catalysent les réactions d'oxydoréduction

déshydrogénases, oxidases, réductases, peroxidases, catalases, oxygénases, hydroxylases

Classe 2: transférases, assurent le transfert de groupements fonctionnels

transaldolase et transkétolase, acyl-, méthyl-, glucosyl- et phosphoryl-transférases, kinases, phosphomutases

Classe 3: hydrolases, catalysent les réactions d'hydrolyse

estérases, glycosidases, peptidases, phosphatases, thiolases, phospholipases, amidases, désaminases, ribonucléases

Classe 4: lyases, enlèvent un groupement au substrat en laissant une double liaison ou au contraire fixent un groupement sur une double liaison

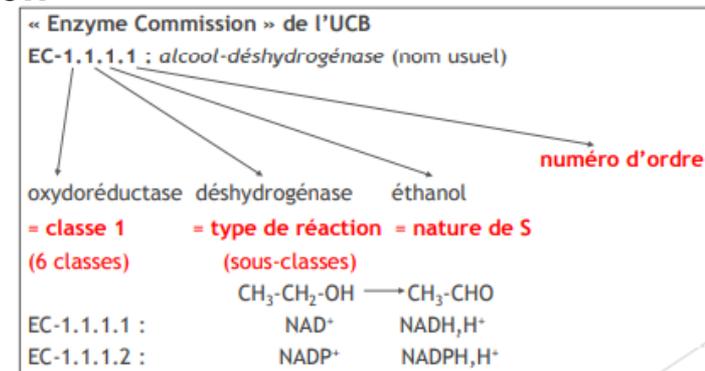
décarboxylases, aldolases, hydratases, déshydratases, synthases, lyases

Classe 5: isomérases, catalysent les réactions d'isomérisation

racémases, epimérases, isomérases, mutases

Classe 6: ligases, établissent une liaison C-O, C-S, C-N, C-C, avec coupure simultanée d'une molécule d'ATP

synthétases, carboxylases



Les coenzymes

Coenzymes :

- molécules biologiques **indispensables** à la catalyse enzymatique
- liés par des liaisons covalentes (groupement prosthétique) ou liaison faible à l'enzyme
- **Régénérés** (parfois indirectement) à la fin de la réaction enzymatique

Types de Coenzymes :

- **coenzymes vrais** : métalliques ou dérivés vitamines B (autres : lipoate, BH₄)
directement régénérés par la réaction enzymatique
- **co-substrats** : NAD/NADH, FAD/FADH₂ sera régénérer par l'intervention d'autres enzymes (indirecte)

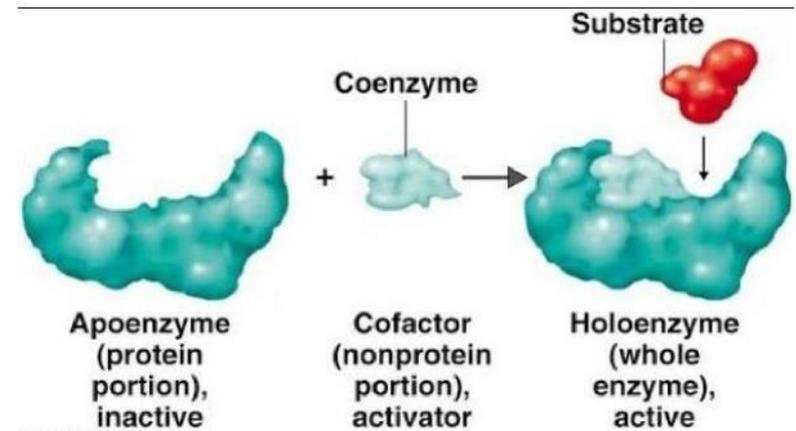
apoenzyme & holoenzyme

Apoenzyme + coenzyme = holoenzyme

Partie protéique + non protéique = enzyme fonctionnelle

Méthylmalonyl-CoA mutase + adénosylcobalamine

Pyruvate carboxylase + biotine



les coenzymes métalliques

Eléments	Enzyme
Fe²⁺/Fe³⁺	Cytochromes, peroxydases, catalases
Cu⁺/Cu²⁺	Cytochrome oxydase, tyrosinase
Mg²⁺	Phosphotransférases
Mn²⁺	Arginase, enzymes à biotine
Zn²⁺	Alcool déshydrogénase, anhydrase carbonique
K ⁺	Pyruvate kinase
Na ⁺	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase membranaire
Mo	Xanthine oxydase, sulfite oxydase
Se	Glutathion peroxydase
Cl ⁻	Enzyme de conversion, α -amylase
Ni ²⁺	Uréase
Ca ²⁺	Phosphorylase kinase

LES COENZYMES vitaminiques

QCM

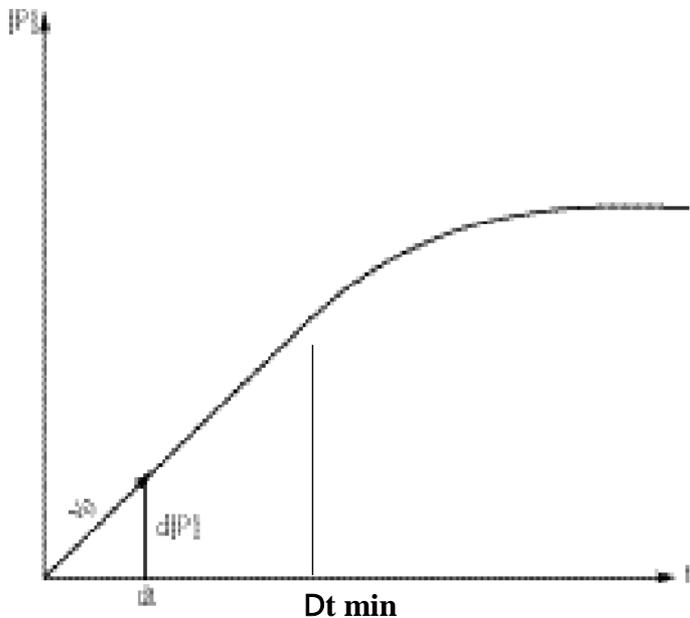
Vitamine	Coenzyme	Systèmes enzymatiques
B1 (thiamine)	Thiamine Pyrophosphate	Pyruvate déshydrogénase α -cétoglutarate déshydrogénase α -cétacide déshydrogénase
B6 (pyridoxine)	Pyridoxal Phosphate	Transaminases
B12 (cobalamine)	méthylcobalamine adénosylcobalamine	Méthionine synthase Méthylmalonyl-CoA mutase
B8 biotine	Biotine-(lysine-prot)	Pyruvate carboxylase
B9 Acide folique	X-THF (X =CH, CH ₂ , CH ₃)	Méthionine synthase (CH ₃ -THF)
B3 Nicotinate (Niacine)	NAD(P)	α -cétacide déshydrogénases
B2 (Riboflavine)	FAD	Pyruvate déshydrogénase
B5 Pantothénate	Coenzyme A	Pyruvate déshydrogénase

Vitesse d'une réaction

Vitesse de réaction = **nombre de moles de substrat transformées** en moles de produit, dans un **volume** donné et dans un **temps** donné

$d[S]=f(t)$ fonction décroissante

$d[P]=f(t)$ fonction croissante



Courbe cinétique

Vitesse de la réaction : cinétique

$$V = d[P]/dt = -d[S]/dt$$



Représentez variation de S ou E

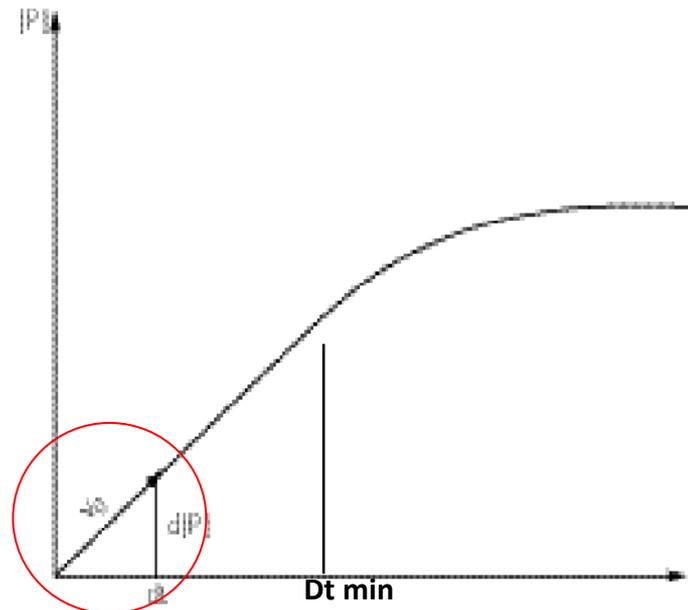
Activité enzymatique = Notion de vitesse initiale V_0 ou V_i conditions conventionnelles

N'importe quelle vitesse

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

vitesse initiale : $V_0 = k_2 [ES]$

Expérimentalement : V_0 tangente de $[P] = f(t)$ qd $t \rightarrow 0$, ne se vérifie que pendant un temps limité



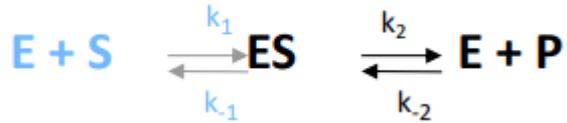
Equation de Henry Michaellis Menton

Hypothèse 1 : 1 seul S et P $S + S' \leftrightarrow P + P'$

Hypothèse 2 : $k_{-2}[E][P] \approx 0$ (vitesse retour négligeable)

Hypothèse 3 : équilibre rapide entre E, S et ES

Hypothèse 4 : S libre assimilable à So car $[E] \ll [S]$



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

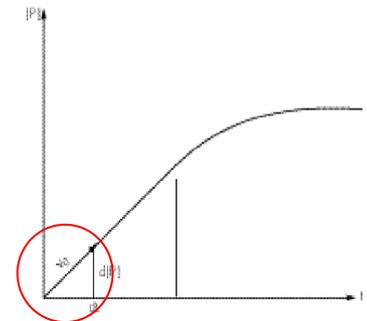
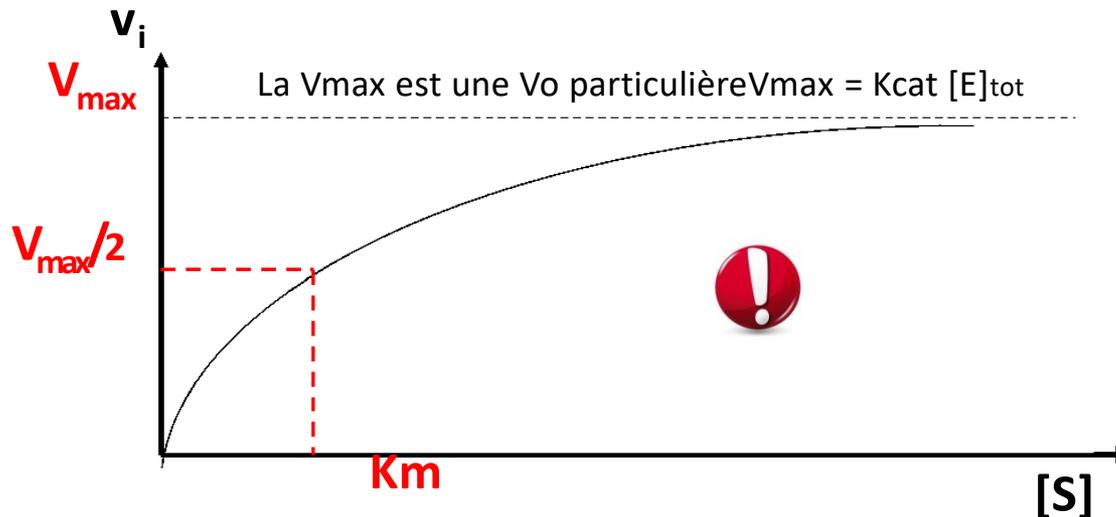


Si $[S] \gg K_m \Rightarrow V_{\max} = K_{\text{cat}} \cdot [E]_{\text{tot}}$



en pratique $[S] > 10 \cdot K_m \Rightarrow a/(a+1) = 0,91$

Pour $[S] = K_m \Rightarrow V_o = V_{\max}/2 \Rightarrow a/(a+1) = 1/2$



Il n'y a que 2 constantes en enzymologie :

K_M : concentration en substrat permettant une demi-saturation de l'enzyme.

S'apparente au K_d ($\geq K_M = (k_{-1} + k_{+2}) / k_{+1}$).

Reflète l'inverse de l'affinité.

Lorsque (S) est exprimé en nombre de K_M i.e., $(S) = a K_M$, la fonction de saturation prend la forme simple (peut s'exprimer en %) :

$$\bar{Y}_S = \frac{v_0}{V_{\max}} = \frac{(ES)}{(E)_t} = \frac{a}{a+1}$$



K_{cat} : correspond lorsque l'enzyme est saturée par le substrat, au nombre de cycles catalytiques effectués par site enzymatique et par unité de temps = nombre de turn over = activité moléculaire spécifique
nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme quand celle-ci est saturée par son substrat par unité de temps ($1/K_{cat}$: temps de rotation)



Efficacité catalytique : K_{cat}/K_M



« Doser » une enzyme = mesurer une activité enzymatique

= mesurer une **vitesse initiale** ou mesurer une **concentration catalytique**

2 modes d'expression pour exprimer une activité enzymatique

mesurer une **vitesse initiale** : unité dérivée de **$\mu\text{mol/L/min}$**

mesurer une **concentration catalytique** : unités **U/L ou Kat/L ; U/g ou Kat/g**



2 unités pour exprimer une concentration catalytique

unité (U) d'enzyme = quantité d'enzyme qui en conditions conventionnelles consomme 1 **μmole** de substrat ou produit **1 μmole** de produit par **minute**.

le **katal (kat)** d'enzyme = quantité d'enzyme qui en conditions conventionnelles consomme 1 **mole** de substrat ou produit **1 mole** de produit par **seconde**.



$$1 \text{ kat} = 60 \cdot 10^{-6} \text{ U}$$

Conditions conventionnelles = conditions de vitesse initiale parfaitement définies

Cinétique enzymatique

– Notions et dimensions :

K_M est une concentration : mol/L

V_{max} est une vitesse initiale particulière : $\mu\text{mol/L/min}$

K_{cat} : activité moléculaire spécifique (turn over); t^{-1}



Représentations graphiques de l'équation de HMM

– $V_o = f([S])$ HMM

– $1/V_o = f(1/[S])$ Lineweaver Burk

– $V_o = f(V_o/[S])$ Eadie Hofstie

– $(V_{max} = f(K_M))$ Cornish-Bowden)



Purification d'une enzyme :

le **rendement ρ** en AE (%) est un critère quantitatif : il correspond au **rapport entre la quantité d'enzyme** récupérée **en fin** d'étape sur la **quantité d'enzyme introduite en début d'étape**.

La quantité d'enzyme dénommée **quantité catalytique (QC)** s'exprime en unités arbitraires (**U, katal**) et se calcule par le produit (en unités compatibles) de la concentration catalytique et du volume :

$$QC (U) = CC_{(U/L)} * volume (L)$$

$$\rho = \text{Qtté catalytique finale} / \text{Qtté catalytique initiale} \times 100 (\%)$$



Purification d'une enzyme :

l'activité spécifique (AS) est un critère plutôt qualitatif : l'**AS** exprime la quantité d'enzyme (**QC**) dans le milieu par rapport à la quantité de protéines totales. Correspond au rapport (**en unités compatibles**) entre la concentration d'enzyme (CC) et la concentration **pondérale** en protéines totales

$$\text{AS}_{(\text{U/g de protéines totales})} = \text{Qtté Catalytique} / \text{Qtté prot totales}$$

$$= \text{Conc Catalytique}_{(\text{U/L})} / [\text{prot totales}]_{(\text{g/L})}$$



Purification d'une enzyme :

le **degré de purification** ou **facteur/index de purification** ou **d'enrichissement** est aussi un critère qualitatif : il mesure l'efficacité d'une étape de purification par le rapport des AS en fin d'étape sur l'AS en début d'étape

degré de purification = AS (fin) / AS (début) sans unité



Inhibiteurs :



Degré d'inhibition $= \frac{v_0 - v_i}{v_0}$

Facteur commun à toutes les inhibitions $1 + [I]/K_i$

K_i : constante de dissociation de l'inhibiteur

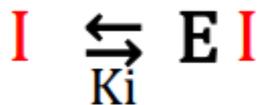
Dans tous les cas, l'inhibiteur diminue la vitesse initiale, mais il peut affecter le K_m et/ou la V_m

=> Modèles simples d'inhibition rapidement réversible

Inhibition Compétitive



+

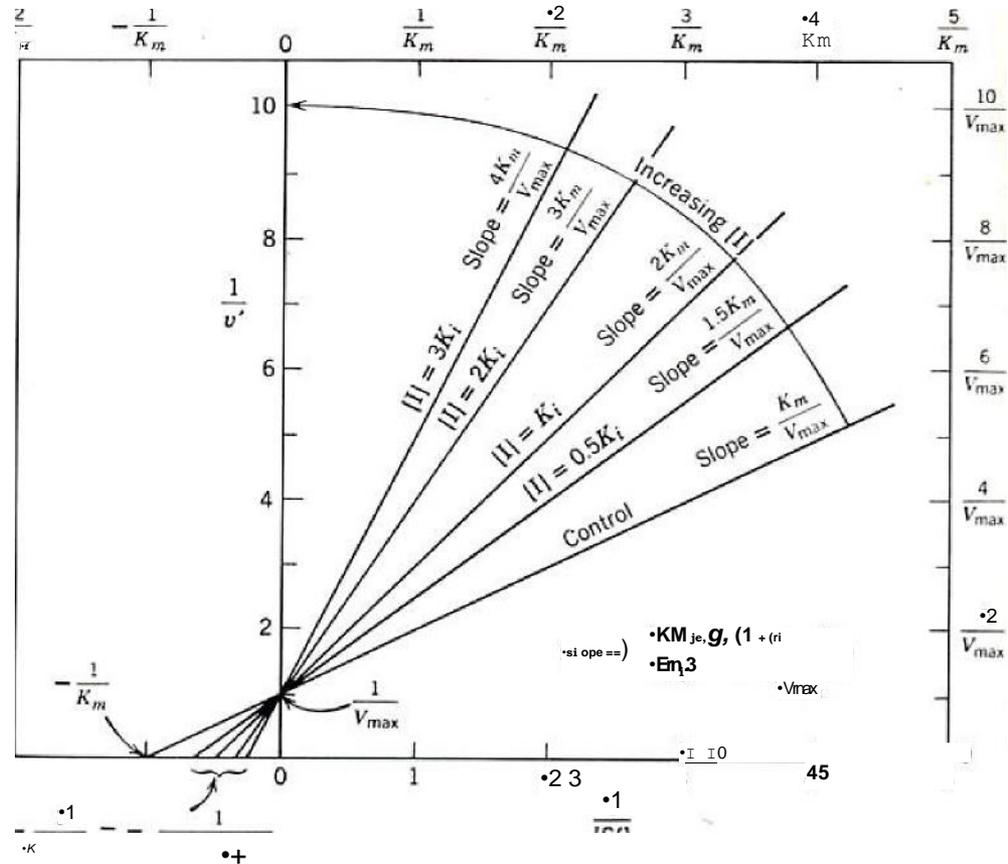


- Compétition entre S et I pour le même site de fixation, la fixation de l'un exclu l'autre
- Souvent analogue structural (généralement non métabolisable), peut être le produit
- Exemple des retroinhibitions des voies métaboliques
- K_{Mapp} augmente = $K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$ V_{max_app} inchangée = V_{max}
- % inhib diminue quand S augmente (non linéaire)

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{(S)}{K_m \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right] + (S)} = \frac{(S)}{K_{mapp} + (S)}$$

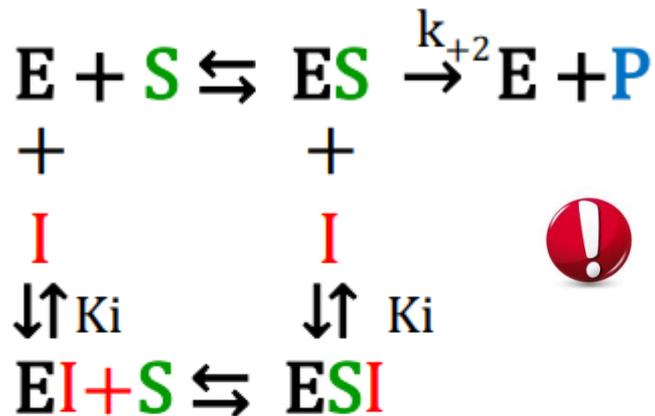

$$\frac{v_0 - v_i}{v_0} = \frac{(I)}{(I) + K_i \left(1 + \frac{(S)}{K_m} \right)}$$

Inhibition Compétitive



•Fig. III-4. The $1/v$ versus $1/[S]$ plot in the presence of different fixed concentrations of a competitive inhibitor.

Inhibition Non Compétitive

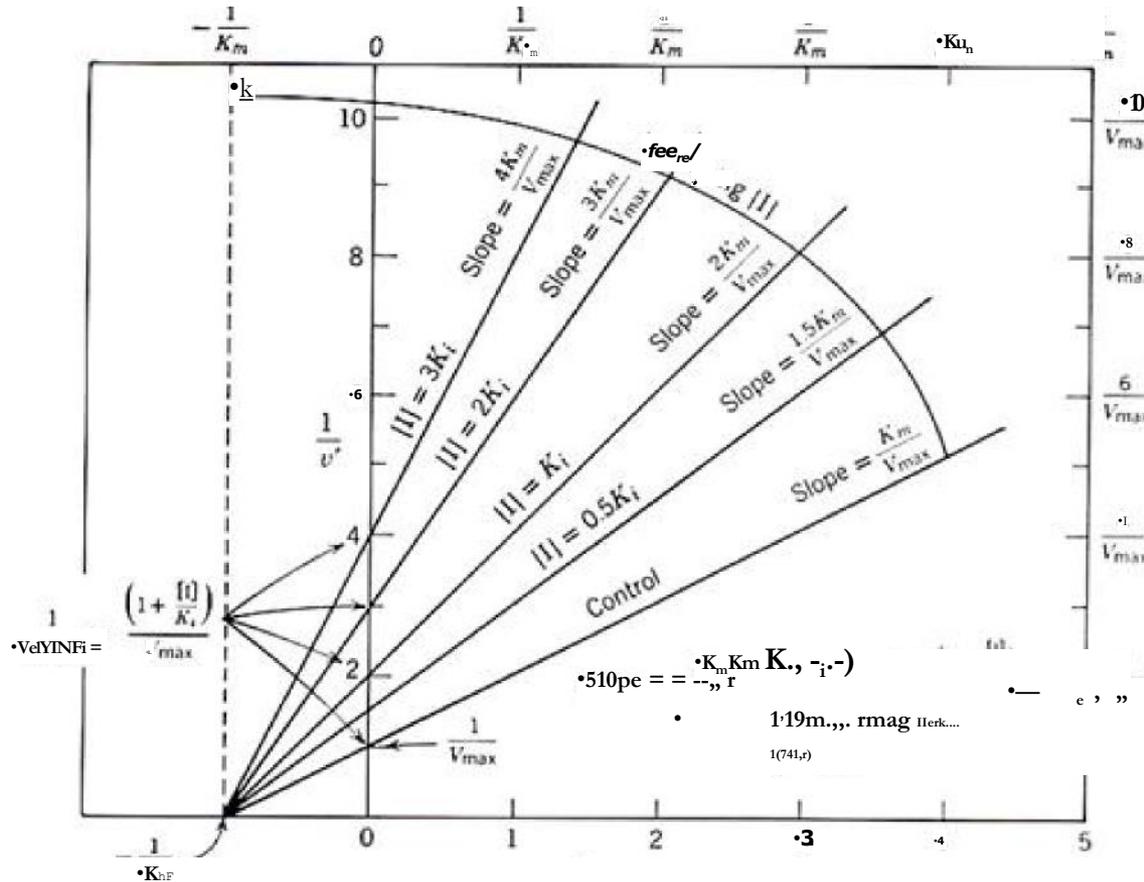


- S et I ont des sites de fixation indépendant
- I modifie le site catalytique et rend le complexe ESI non productif
- K_{Mapp} inchangée = K_M $V_{max\ app}$ diminue = $V_{max}/(1+[I]/K_i)$
- % inhib est indépendant de la concentration en S

$$v_0 = \frac{V_{max}(S)}{[K_s + (S)]} \text{ avec } V_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{(I)}{K_i}} \quad \frac{v_0 - v_i}{v_0} = 1 - \frac{K_i}{K_i + (I)} = \frac{(I)}{K_i + (I)}$$

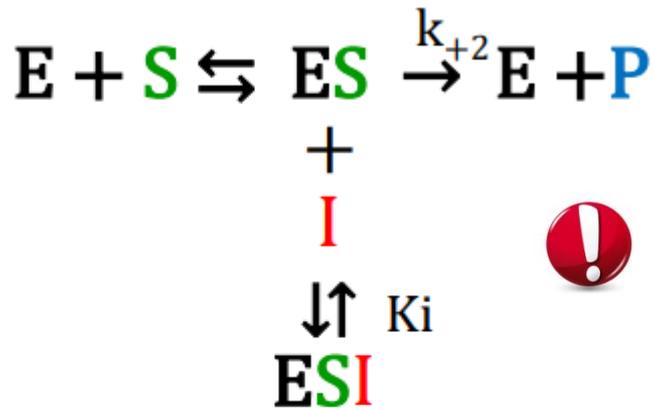


Inhibition Non Compétitive



•Fig. III-17. The $1/v$ versus $1/[S]$ plot in the presence of different concentrations of a non-competitive inhibitor.

Inhibition Incompétitive



1 S se fixe en premier et en changeant la conformation de l'enzyme fait apparaître le site de fixation de I

2 I se lie à ES et a) modifie le site catalytique et rend le complexe ESI non productif et b) augmente l'affinité de l'enzyme pour son substrat

- K_{Mapp} diminue = $K_M / (1 + [I]/K_i)$ $V_{max, app}$ diminue = $V_{max} / (1 + [I]/K_i)$
- % inhib augmente avec la concentration en S

$$v_0 = \frac{V_{max,i}(S)}{[K_{si} + (S)]} \text{ avec } V_{max,i} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{(I)}{K_i}} \text{ et } K_{si} = \frac{K_s}{1 + \frac{(I)}{K_i}} \quad = \frac{v_0 - v_i}{v_0} = \frac{(I)}{(I) + K_i(1 + \frac{K_m}{(S)})}$$



Applications

1. Mesure d'une Activité Enzymatique → V_0

$V_0 = k.(E)^1$ mesure indirecte de (E), $V_0 = f(Et)$

- Conditions standardisées = « conventionnelles »
- $k = \text{cte}$ pour des conditions définies
- Dans ces conditions V_0 varie comme (E) et de ce fait est exprimée en unités arbitraires: **U/L ou kat/L = concentration catalytique CC**
- **Optimisation** on essaie de se placer en situation le plus proche possible de V_{max} : mais ce n'est pas toujours le cas.
- Intérêt à être le plus proche possible de V_{max} cad $[S]$ égale ou sup à $10 \times K_m$) **mais pas obligatoire !**



Formule générale de mesure d'activité enzymatique par suivi de l'absorbance

$$V_0 = DA \cdot \text{Vol}_{\text{tot}} / Dt \cdot V_{\text{ech}} \cdot 1/\epsilon \cdot l$$



Applications

2. Dosage d'un substrat par une enzyme



$V_0 = k \cdot (S)_0$ mesure de (S) méthode cinétique en temps fixés

- Conditions : **(S) « K_M** $V_0 = \text{cste} \cdot [S]$ $V_{\text{max}} / K_M = \text{cste}$ pour conditions fixées
- En pratique V_0 est difficilement mesurable; conditions proches de $V_0 = \text{cinétique}$ en temps fixé avec $\Delta(S)/(S)_0 < 5$ à 10 %
- Besoin d'un standard (étalon) et de pas changer les conditions opératoires.

$$v_0 = -\frac{d(S)}{dt} = \frac{V_{\text{max}}}{K_M}(S) = k(S) \quad \Rightarrow \quad (S) = (S)_0 e^{-kt}$$

$$\Delta(S) = (S)_2 - (S)_1 = (S)_0 [e^{-kt_2} - e^{-kt_1}] \quad (S)_0 = \frac{\Delta(S)}{[e^{-kt_2} - e^{-kt_1}]}$$

$$(S)_0 = \frac{\Delta A}{\epsilon l [e^{-kt_2} - e^{-kt_1}]} = K \Delta A$$

Applications

2. Dosage d'un substrat par une enzyme

méthode en point finale

- Conditions : réaction totale et irréversible (à vérifier)
- Cf exo



Méthode

Lire très attentivement l'énoncé

!!! Facteurs de dilution

Impérativement se poser les questions

1. où se place-t-on ? dans la cuve (milieu réactionnel) ou au niveau de l'échantillon

2. À quel moment? (préincubation, incubation)

- Réponse minimale : **formule générale, application numérique, unité** et si possible règle d'application, phrase de conclusion
- Tableau de purification **écrire les formules générales et directement remplir un tableau avec unité dans colonne**
- Si graphe à tracer faire un tableau de données avec abscisses et ordonnées (attention au temps, échelle simple)