

Université des Sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

**Module:** Enzymologie

**Parcours:** M1 QPSA

**Responsable des TD, TP:** Mme Errouane Kheira

**TD1 :**

Fiche de TD 1 Enzymologie

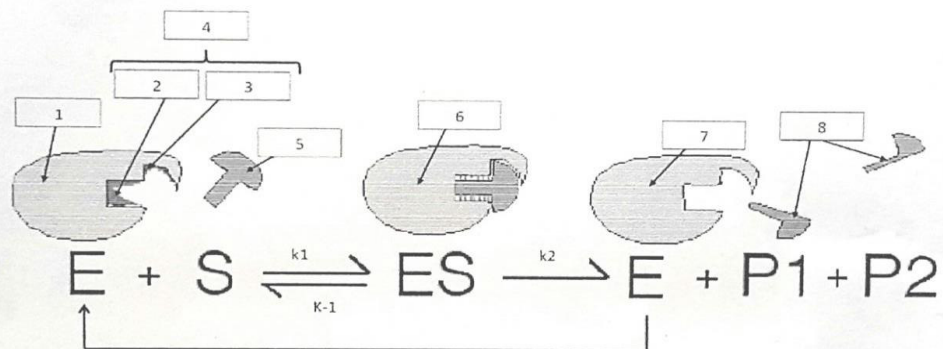
1/Définissez « enzyme »

2/Comment nomme-t-on les réactifs d'une réaction enzymatique

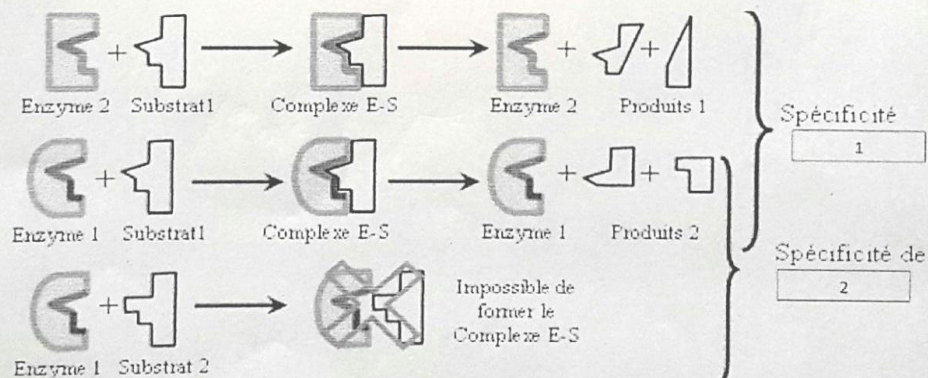
3/Comment nomme-t-on les composés résultant d'une réaction enzymatique

4/Comment nomme-t-on l'action de l'enzyme

5/Titrez et légendez la figure suivante. Puis décrivez la structure n° 4. Enfin décrivez les différentes étapes de la réaction illustrée.



6/Titrez et légendez la figure suivante, expliquez ce qu'elle présente



## TD2 : Cofacteurs et Coenzymes

Figure 1. Le coenzyme Nicotinamide Adénine Dinucléotide ou NAD

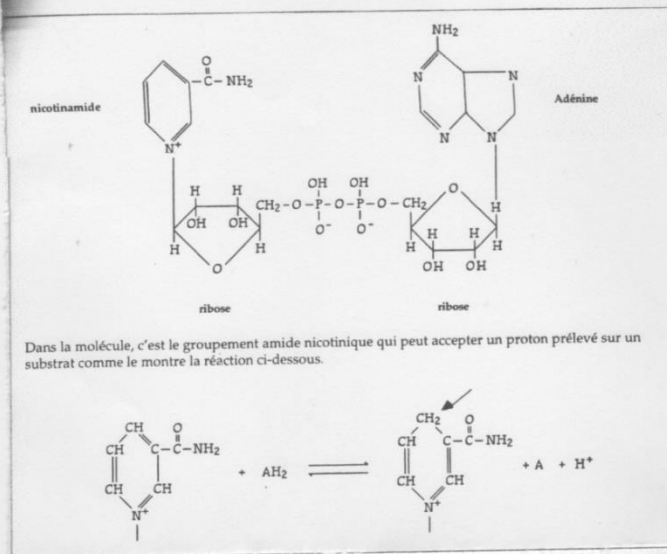


Figure 2. Transformation du pyruvate en acétyl coenzyme A

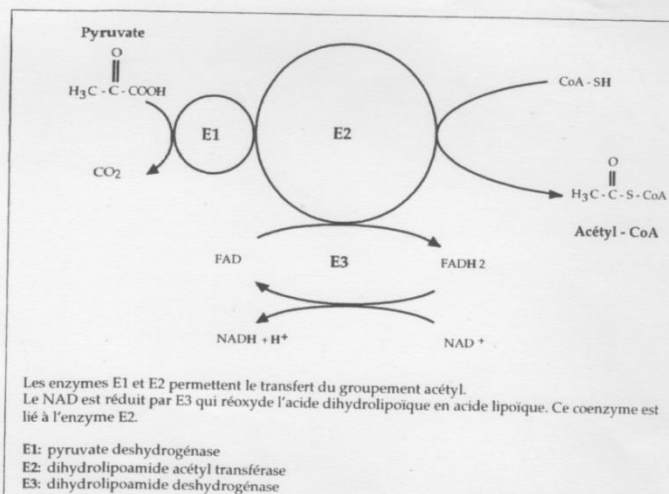
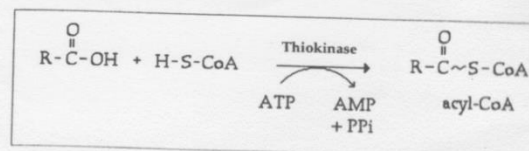
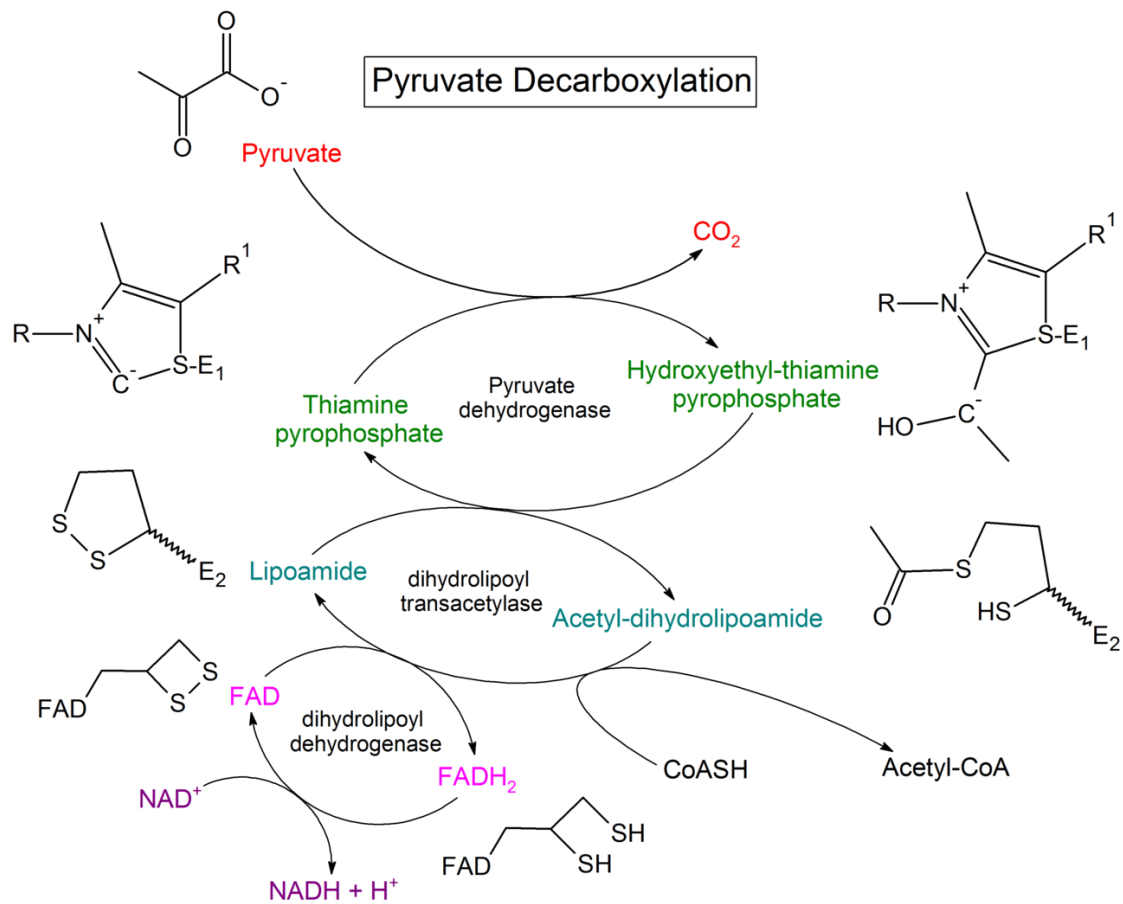


Figure 3. Le coenzyme A ou coenzyme d'acylation





### Questions :

- 1- qu'est ce qu'un cofacteur
- 2- Existe-t-il de différence entre cofacteur et coenzyme. Expliquer la réponse
- 3- Donnez trois exemples de coenzymes et de cofacteur (en consultant les schémas)
- 4- De quelle classe est la chymotrypsine selon la nomenclature EC

## **TD3: Origine et extraction des enzymes**

### **1. Définitions**

- Enzyme : Molécule biologique pouvant accélérer la vitesse d'une réaction biochimique thermodynamiquement possible. Les enzymes sont des protéines.
- Catalyseur : substance qui accélère des réactions chimiques mais n'est pas transformée après la réaction. Il existe des catalyseurs métalliques et des biocatalyseurs, comme les enzymes, qui sont des macromolécules fabriquées par les êtres vivants. Ces derniers abaissent l'énergie d'activation de la réaction.

### **2. Fonction biologique des enzymes**

Les enzymes remplissent un grand nombre de fonctions au sein des êtres vivants.

Elles sont indispensables aux mécanismes de transduction de signal et de régulation des processus cellulaires, souvent à travers l'activité de kinases et de phosphatases.

Elles interviennent également dans la génération de mouvements, comme la myosine qui hydrolyse l'ATP lors de la contraction musculaire et permet le transport de molécules à travers la cellule en agissant sur le cytosquelette.

Les pompes à ions des membranes cellulaires sont d'autres ATPases qui interviennent dans le transport actif transmembranaire.

Des enzymes interviennent également dans des processus plus exotiques tels que la bioluminescence produite par exemple par la luciférase chez les lucioles, ou encore par certaines bactéries.

Les virus contiennent quant à eux des enzymes leur permettant d'infecter des cellules, comme l'intégrase et la transcriptase inverse du VIH, ou de sortir des cellules infectées comme la neuraminidase du virus de la grippe.

Digestion:

Les enzymes jouent un rôle important dans l'appareil digestif humain, où des enzymes telles que les amylases et les peptidases interviennent en dégradant des biopolymères comme l'amidon et les protéines en petites

molécules susceptibles d'être absorbées au niveau des intestins — respectivement en maltose (puis en glucose) et en acides  $\alpha$ -aminés dans notre exemple.

La digestion recouvre précisément ce processus de clivage des macromolécules en petites molécules. Des enzymes différentes sont nécessaires pour digérer des substances différentes.

### 3. Application industrielle

Les tableaux ci-dessous résument quelques applications industrielles de certaines enzymes courantes.

<b>Application industrielle</b>	<b>Enzymes employées</b>	<b>Utilisations</b>
<b>Industrie des biocarburants</b>	Cellulases	Dégradation de la cellulose en glucides simples qui peuvent être fermentés pour produire de l'éthanol cellulosique.
	Ligninases	Prétraitement de la biomasse pour la production de biocarburants.
<b>Lessive biologique (en)</b>	Peptidases, amylases, lipases	Élimine les protéines, l'amidon, les taches de graisse ou d'huile de la vaisselle ou du linge.
<b>Brassage (Fabrication du</b>	Amylase, glucanases, peptidases	Clivage des polysaccharides et des polypeptides du malt.

moût qui donnera ensuite la bière)	$\beta$ -Glucanases	Amélioration des propriétés de filtration du moût et de la bière.  L'alcool de ces boissons est obtenu lors de la transformation des sucres par des levures dans un processus de fermentation.
	Amylases et pullulanases	Production de bières basse calories et ajustement des caractéristiques de fermentation.
	Acétolactate décarboxylase (ALDC)	Amélioration de l'efficacité de la fermentation en réduisant la formation de diacétyle .
<b>Cuisson des aliments</b>	Papaïne	Utilisation comme attendrisseur pour favoriser la tendreté de la viande en cuisine.
<b>Industrie laitière</b>	Rennine	Hydrolyse des protéines lors de la production de fromages.
	Lipases	<b>Production des camemberts</b>

<b>Processus agroalimentaires</b>	Amylases	<b>Production de sucres à partir d'amidon</b> , par exemple pour produire du sirop de maïs à haute teneur en fructose.
	Peptidases	<b>Réduction de la teneur en protéines de la farine</b> , par exemple lors de la fabrication de <b>biscuits</b> .
	Trypsine	Production de nourriture <b>hypoallergénique (en)</b> .
	Cellulases, pectinases	Amélioration de la <b>clarté des jus de fruits</b> .
<b>Biologie moléculaire</b>	Nucléases, ADN ligase et ADN polymérases	Utilisation d'enzymes de restriction et réaction en chaîne par polymérase afin de créer des ADN recombinants.
<b>Industrie papetière</b>	Xylanases, hémicellulases et lignine peroxydases	Élimination de la lignine du papier kraft très résistant utilisé pour différents types de sacs (sacs biodégradables pour différents types de courses, emballage de

		matériaux lourds, d'emballages résistants).
<b>Hygiène</b>	Peptidases	Nettoyage des protéines des lentilles de contact afin de prévenir les infections.
<b>Traitement de l'amidon</b>	Amylases	Conversion de l'amidon en glucose et divers sirops à sucre inversé.



<b>Enzyme</b>	<b>Application</b>	<b>Secteur</b>
Protéase	Dégradation des protéines	Détergents
Cellulase	Dégradation du cellulose	Détergents
Lipase	Dégradation des lipides	Détergents
Amylase	Dégradation de l'amidon	Détergents
Amylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucoamylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucose Isomérase	Production du sirop de glucose à haute teneur en fructose	Traitement de l'amidon
Xylanase	Améliorer l'assimilation des nutriments chez les volailles	Aliments pour animaux
Phytases	Améliorer la disponibilité des nutriments	Aliments pour animaux
Protéases	Améliorer la digestion des protéines	Aliments pour animaux
Xylanase	Élimination de la lignine « blanchiment biologique »	Papeterie
Arabinanase	Élimination du trouble après macération	Traitement des fruits et légumes
Amylase	Élimination du trouble d'amidon dans les jus	Traitement des fruits et légumes
Polygalacturonanase	Augmenter le rendement en jus	Traitement des fruits et légumes
Hydrolases	Casser les gels de biopolymères	Gaz et pétrole
Chymosine	Caillage lors de la production de fromages	Produits laitiers
Uréase	Élimination de l'urée	Vin
Pectinase	Augmenter le rendement en jus	Vin
Protéase	Attendrissement des viandes	Boucherie
Amylase	Désencollage	Textiles
Amylase	Contrôle de procédé	Boulangerie
Beta-glucanase	Éviter les problèmes de filtration	Bière
Protéase	Augmenter le rendement de surface	Tannerie

## **4. origine enzyme**

### **4.1 Origine animale**

### **4.2 Origine végétale**

### **4. 3 origines microbiennes**

#### **4.1 Protéases d'origine animale**

Les enzymes coagulants (ex coagulation du lait) d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure (constitué principalement de chymosine), les pepsines; bovine, porcine et de poulet. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, secrété par la muqueuse gastrique. Le zymogène de la pepsine est appelé pepsinogène alors que celui de la chymosine est appelé prochymosine. Comparé à l'enzyme actif, le zymogène possède un segment peptidique supplémentaire liée de la partie N-terminal de l'enzyme actif. Au niveau de la structure tridimensionnelle, cette chaîne peptidique, souvent nommée prosegment, occupe le site actif et sert à bloquer l'entrée du substrat. Ainsi l'activation du proenzyme nécessite la libération du prosegment et la dissociation de ce dernier du site actif.

Les zymogènes gastriques, stables à pH neutre, sont convertis en enzyme actif sous l'effet de l'acidité naturelle du milieu stomacal. La conversion à lieu à des pH inférieur à 5.

#### **4.1-1. La présure**

La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages ; de petites quantités sont produites à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau. Selon la fédération internationale du lait (FIL) la dénomination «présure» est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillottes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (ANDREN, 2002). Elle contient en réalité deux fractions actives, l'une, majeure, constituée par la chymosine, l'autre, mineure, par la pepsine. Au pH du lait (6,2-6,6), la chymosine représente plus de 80 % de l'activité coagulante. La sécrétion de chymosine s'arrête au moment du sevrage lorsque des aliments solides sont présents

dans la ration alimentaire, la production de pepsine s'accroît alors très fortement et devient dominante.

L'obtention de présure à partir de veaux fistulés a fait l'objet de plusieurs expériences.

La collecte de présure, deux fois par jour, jusqu'à ce que les veaux atteignent trois à quatre mois, a permis l'obtention d'une quantité de présure 30 à 40 fois plus importante que celle obtenue par veau après abattage.

Toutefois, le coût opératoire et les risques cliniques ont limité le développement de ce procédé.

L'obtention de chymosine par transgénèse connaît actuellement un grand développement, vu le rendement élevé et la qualité de produit obtenue qui est comparable à celle de la chymosine de veau.

La chymosine est extraite des caillottes, situées entre l'isthme et le pylore) de veaux sous sa forme inactive. Le prochymosine est ensuite activé par une protéolyse limitée. Cette action est accompagnée par une réduction du poids moléculaire de 36000 à 31000.

Les différentes fractions de la chymosine, désignées par A, B et C, sont toutes actives avec chacune une activité coagulante relative spécifique de 125, 100 et 55-60, respectivement.

La chymosine B est la plus abondante. Aucune différence entre la chymosine A et B n'a été relevée ; cependant, la chymosine C représentait un mélange contenant des produits de dégradation.

#### **4.1-2. La pepsine**

La pepsine est une protéase acide présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux. L'une de ses remarquables caractéristiques est sa grande activité dans cet environnement acide ; elle est active même à pH 1 où plusieurs enzymes et protéines subissent une rapide dénaturation.

#### **4.1-2-1. La pepsine bovine**

La pepsine bovine est extraite à partir des caillottes d'animaux adultes et de veaux sevrés. L'extrait brut contient un pepsinogène majoritaire et plusieurs pepsinogènes mineurs qui donnent après activation à pH 2,0 la série de pepsines correspondant (CHOW et KASSELL, 1968). ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS (1971) ont pu révéler la présence d'une pepsine I et d'une pepsine II dans l'extrait activé de caillotte de bœuf, issus de deux zymogènes différents. La pepsine I est un constituant mineur (ANTONINI et RIBADEAU-DUMAS, 1971). Les propriétés protéolytiques de la pepsine bovine sur les caséines sont plus semblables à celles de la chymosine (ERNSTROM et WONG, 1983 ; BARBANO et RASMUSSEN, 1992). En outre, son activité coagulante est moins dépendante du pH, contrairement à la pepsine porcine et elle provoque la coagulation du lait à pH 6,9. Le Tableau 4 donne quelques caractéristiques de la pepsine bovine.

#### **4.1-2-2. La pepsine porcine**

La pepsine porcine est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc sous sa forme inactive. L'extrait brut de la pepsine contient dans la majorité de la pepsine A et des composés mineurs correspondants aux pepsines B, C, D, et à la gastricsine. Les pepsines sont produites à partir de zymogènes différents. La pepsine B et C provoquent la coagulation du lait mais beaucoup moins rapidement que la pepsine A, majoritaire.

#### **4.1-2-3. La pepsine de poulet**

Le pepsinogène de poulet et la pepsine correspondante ont été partiellement purifiés par HERRIOT, BARTZ et NORTHOP (1938). Ces auteurs ont observé que la pepsine de poulet diffère de la pepsine bovine et porcine par sa stabilité dans les solutions à pH neutre et modérément alcalin. Alors que la pepsine porcine était rapidement inactivée à pH supérieur à 6,5. La pepsine de poulet est stable aux pH de 8 à 8,5.

La composition en acides aminés montre que cette pepsine est moins acide que les autres pepsines étudiées. La pepsine de poulet contient 39 groupements carboxyles

libres et 16 groupements basiques alors que la pepsine porcine contient 40 groupements carboxyles libres et seulement 6 groupements basiques.

L'activité catalytique de la pepsine de poulet est la plus élevée entre pH 1.5 et 4,5 avec un optimum à 2,8 en utilisant l'hémoglobine comme substrat. A pH 1.5, il y a 90% du maximum d'activité et à pH 4.5, 35% du maximum d'activité.

Dans le tube digestif de poulet, la pepsine est sécrétée au niveau du proventricule qui est située légèrement à gauche dans la cavité abdominale entre le jabot et le gésier.

Le suc gastrique entre en action avec les aliments dans le gésier, dans la première portion du duodénum et éventuellement dans le jabot où il arrive par des mouvements de renvoi.

#### **4.2. Protéases d'origine végétale**

Il existe plusieurs préparations coagulantes (coagulation du lait) provenant du règne végétal. Elles sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures. Parmi les espèces connues on peut citer le gaillet, l'artichaut, le chardon qui ont été utilisés jadis dans des fabrications de fromages fermiers au Portugal et en Espagne (SILVA et MALKATA, 2005). D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales ; les plus connus sont la ficine extraite du latex de figuiers : *ficus genus*, *ficus glabatra*, ou *ficus carica*.

Cette enzyme est utilisée dans l'industrie alimentaire (E1101(iv)), dans l'industrie textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers.

Lorsqu'on utilise des figues fraîches avec des produits laitiers, il faut les consommer rapidement car la ficine peut rendre amers les plats à base de produits laitiers; extraite du latex de figuier, la papaine ; extraite des feuilles de papayer, la bromélaïne ; extraite de l'ananas. Ces protéases contrairement aux autres enzymes coagulants appartiennent au groupe de protéases sulphydryls. D'une manière générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée qui induit des pertes dans le rendement fromager et le développement de goût amer au cours de

l'affinage. Ces difficultés résultent de la composition particulière de ces extraits, qui renferment des enzymes à site actif peu spécifique et /ou des systèmes enzymatiques dont il est difficile de maîtriser l'activité.

### **4.3. Protéases d'origine microbienne**

#### **4.3-1. Protéases d'origine bactérienne**

De multiples espèces de bactéries ont été étudiées notamment dans les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présentait une saveur acceptable; cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive.

#### **4.3-2. Protéases d'origine fongique**

Les enzymes d'origine fongique, contrairement à celles d'origine bactérienne, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure; les préparations commerciales employées actuellement proviennent de trois genres de moisissures; *Cryphonectria parasitica*, *Rhizomucor pusillus* et *Rhizomucor Miehei*. La protéase de *Cryphonectria parasitica* a été étudiée et testée dans plusieurs types de fromage. Elle a donné des résultats variables. Elle paraît être plus protéolytique que la présure durant la phase de coagulation du cheddar. En outre, de l'amertume a caractérisé du cheddar préparé par cette protéase (KIM *et al.*, 2004). Toutefois, l'emploi de ces protéases dans certains types de fromage tels que l'emmental a donné un fromage d'excellente qualité. En effet, ce type de fromage subit une cuisson à des températures élevées (51,7-54,4 °C). Ce traitement thermique provoque probablement la destruction de l'activité protéolytique de ces enzymes, ce qui supprime, ainsi, leur effet au cours de l'affinage.

La protéase de *Rhizomucor pusillus* possède une activité protéolytique sur les caséines. La première phase de la fabrication du fromage est leur précipitation par adjonction d'un acide ou de présure d'origine animale extrait de la caillotte (le

quatrième estomac) de jeunes ruminants. Elle est constituée d'enzymes actives appelées chymosine et pepsine. Elle est employée pour la coagulation du lait nécessaire à la fabrication des fromages.). Le mot *caséine* est issu du latin *caseus*, « fromage ».) la plus faible comparée aux autres protéases d'origine fongiques. Son emploi comme substitut de la présure, dans la fabrication de certaines variétés de fromage, a donné des résultats satisfaisants. Une légère amertume est relevée dans le cheddar fabriqué par cette protéase et seulement après 14 mois de stockage. Cependant, elle est plus protéolytique que la chymosine.

Comparée à la présure, la protéase de *Rhizomucor miehei* a donné un rendement et une qualité de fromage similaires, lors de la fabrication l'emmental. Aucun développement de l'amertume n'a été observé (RICHARDSON, 1975). Toutefois, comparé à la présure des pertes de matière grasse et de protéine, dans le lactosérum, plus importantes, sont relevées lors de la préparation du cheddar avec les protéases de *Cryphonectria parasitica* et de *Rhizomucro miehei*.

Sur les moisissures *Penicillium caseicolum* et *Penicillium roquejorti*, agents de la maturation de nombreux fromages à pâte molle ou de fromages persillés. Un programme de recherche qui fait l'objet d'une Convention de la D.G.R.S.T. est actuellement en cours.

## **5. Production d'enzymes industrielles et extraction**

L'enzyme est produite dans des fermenteurs de très grands volumes (plusieurs m<sup>3</sup>) à partir d'organisme génétiquement modifié du champignon *Aspergillus niger* avec un procédé économique en ressources. Le produit est vendu après extraction, et séchage sans purification : sous forme de préparation enzymatique. Puis purification (protocole d'extraction voir annexe)

## TP1: Analyse enzymatique de l'amylase

**Objectif :** extraire une enzyme et étudier son activité

**Matériel :** Grains d'orge germés, eau distillée, mortier et pilon, une balance, centrifugeuse, papier filtre, bain-marie, amidon, pipette, éprouvette, bécher micropipette, solution tampon (pH 7), solution (S) HCl, lugol.

### Manipulation 1 : Préparation de l'extrait enzymatique

-Récupérer environ 5 g de plantules de grains d'orges germés et les broyer dans 1g de sables et 25 ml d'eau distillée.

-Centrifuger et filtrer.

### Manipulation 2 : Préparation du substrat

-Peser l'amidon, et le dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

-Chauffer la solution jusqu'à ce que le liquide devienne limpide.

### Manipulation 3 : Tester l'activité enzymatique

-Réaliser les mélanges suivants :

	1	2	3	4	5	6
Extrait enzymatique EE (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Eau distillée (ml)	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95
Substrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution tampon (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

-Après ajout de l'extrait enzymatique, incuber les mélanges à 37°C.

-Prélever 50 µl du mélange et l'ajouter à 100 µl de lugol.

-Après chaque minute refaire l'opération jusqu'à disparition totale de l'amidon.

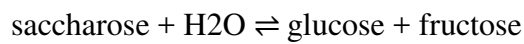


-Noter le temps (T) nécessaire à la catalyse pour chaque dilution de l'EE.

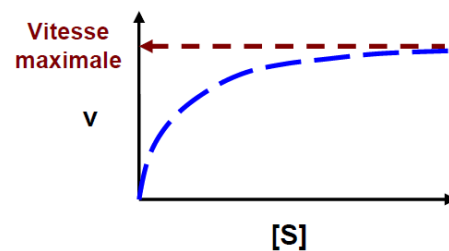
### TD3 Cinétique enzymatique

Les réactions chimiques dans les cellules sont faites par des enzymes. Les mesures cinétiques sont parmi les outils les plus puissants pour élucider les mécanismes enzymatiques. C'est donc un des aspects les plus importants de l'enzymologie; ces mesures nous informent sur la spécificité de la réaction enzymatique et sur les caractéristiques physiques de l'enzyme. En pratique, ces mesures sont essentielles en biochimie clinique, puisqu'elles permettent de détecter des anomalies pathologiques.

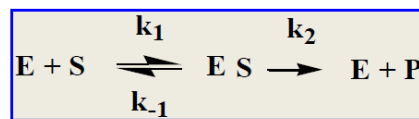
L'étude de la cinétique enzymatique a commencé en 1902 quand Adrian Brown a examiné la vitesse d'hydrolyse de saccharose par l'enzyme invertase



Brown a démontré que lorsque la concentration de saccharose S dépasse celle de l'enzyme, la vitesse de la réaction devient indépendante de la concentration de saccharose ou ordre zéro par rapport au saccharose.



Il a donc proposé que la réaction globale est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme. Soit



où E, S, ES, et P symbolisent l'enzyme, substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit, respectivement

Selon ce modèle, *lorsque la concentration de substrat devient suffisamment importante afin de capter toute l'enzyme sous forme ES, la deuxième étape de la réaction est limitante et la réaction globale devient insensible aux augmentations supplémentaires en concentration de substrat.*

Les principes généraux des réactions chimiques s'appliquent aux réactions enzymatiques. Dans une réaction chimique, le taux de catalyse ( $v$ ) est défini par le changement dans la concentration du produit final par unité de temps. Le taux de catalyse est proportionnel à la concentration du substrat.

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

Dans une réaction enzymatique, le taux de catalyse ( $v$ ) est aussi la variation dans la concentration du produit final par unité de temps.

La vitesse globale de la réaction est définie de façon similaire par

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

La vitesse de production de ES est la différence entre les vitesses des réactions élémentaires décrivant la formation de ES et sa disparition

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

Cette équation différentielle ne peut pas être intégrée de façon explicite pour tous les cas sans des approximations simplifiées:

### 1. Équilibre rapide

En 1913, Léonure Michaelis et Maud Menten ont fait l'approximation que  $k_{-1} \gg k_2$  pour que la première étape de la réaction soit toujours en équilibre rapide.

Donc,  $K_S = k_{-1} / k_1 = [E][S] / [ES]$  qui est la constante de dissociation du substrat de l'enzyme.

Le complexe non-covalent ES entre enzyme et substrat est connu par le nom de complexe Michaelis.

### 2. État stationnaire

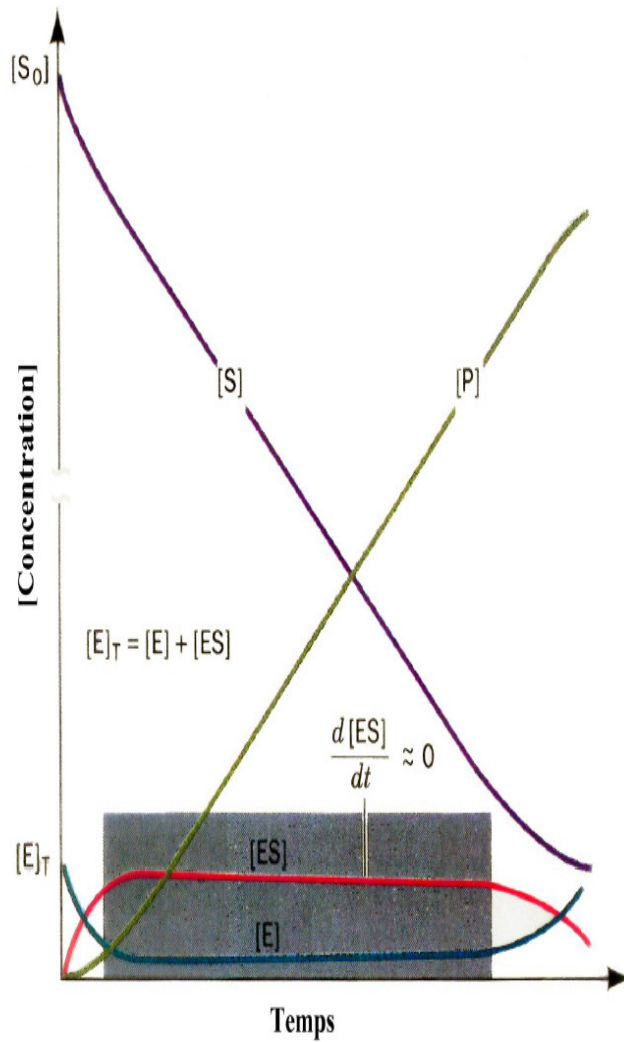
La concentration d'ES est relativement constante pendant la majorité de la réaction, si  $[S] \gg [E]$ . (Voir courbes d'évolution des composés ci-bas et noter les régimes stationnaire et transitoire)

Ceci implique que la vitesse de formation de ES doit être égale à sa disparition. Par conséquent,  $d[ES]/dt = 0$ .

Désignation connue sous forme d'approximation de l'état stationnaire proposé d'abord par Briggs et Haldane en 1925.

L'approximation de l'état stationnaire en assumant que la réaction est à l'état stable, c'est-à-dire que  $[ES]$  est stable est moins restrictive que celle de Michaelis-Menten et sera utilisée dans le développement de la relation entre  $[S]$  et  $v$ .

# Courbes d'évolution



Évolution des composés lors d'une réaction de Michaelis-Menten simple. À l'exception de la phase transitoire de la réaction, qui précède le rectangle ombré, les pentes des courbes d'évolution de [E] et [ES] sont pratiquement égales à 0 tant que  $[S] \gg [E]_T$  (à l'intérieur du rectangle ombré).

Les concentrations de [E] et [ES] ne sont pas de façon générale mesurable. Mais la concentration totale de l'enzyme  $[E]_T = [E] + [ES]$  peut être facilement déterminée.

Vu que la vitesse  $v = k_2 [ES]$  comment peut-on définir [ES] ?

Selon la prémisses que [ES] est stable durant la réaction, la formation de [ES] est égale à sa décomposition. Donc,

$$k_1 [E][S] = k_2 [ES] + k_{-1} [ES]$$

$$\text{et } [ES] = \frac{[E][S]}{(k_{-1} + k_2) / k_1} = \frac{[E][S]}{K_M}$$

où  $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$  représente la constante de Michaelis-Menten.

Comment peut-on définir les valeurs de [E] et [S] ?

Pour les conditions stationnaires, il faut que la concentration du substrat soit beaucoup plus grande que celle de l'enzyme. Donc la portion de substrat associée au complexe ES est négligeable. Par conséquent, [S] est très près de [S] totale.

$$\text{Par contre, } [E] = [E]_T - [ES]$$

En remplaçant [E] dans l'équation précédente, nous obtenons une équation dans laquelle toutes les valeurs sont mesurables.

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

$$\text{d'où: } [ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]}$$

Nous pouvons remplacer la valeur de [ES] dans l'équation originale  $v = k_2 [ES]$  pour obtenir :

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

Le taux de catalyse maximal défini par  $V_{\max} = k_2 [E]_T$  ( $M.s^{-1}$ ) car, le taux de catalyse maximal est obtenu lorsque tous les sites de liaison sont saturés, c'est-à-dire lorsque la concentration du substrat est plus grande que le  $K_M$ .

Dans ces conditions, le ratio  $[S] / ([S] + K_M)$  tend vers 1.

Le ratio  $[S] / ([S] + K_M)$  représente la fraction des enzymes occupés par un substrat puisque

$$f_{ES} = \frac{[ES]}{[E]_T} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{et} \quad \frac{v}{k_2[E]_T} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{v}{V_{MAX}} = f_{ES}$$

Le taux de catalyse est donc :

$$v = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

Cette équation est connue sous le nom de **l'équation de Michaelis-Menten**

Le taux de catalyse est donc proportionnel :

- au taux de catalyse maximal,  $V_{MAX}$ , et
- à la fraction des enzymes qui sont occupés par un substrat,  $f_{ES}$ .

Implicite dans le modèle michaelienne est que la formation du produit P à partir du complexe ES soit irréversible, qui n'est pas réaliste. Afin d'assurer que la vitesse de retour,  $E + P \rightleftharpoons ES$ , soit négligeable expérimentalement, elle doit être mesurée avant qu'il y ait une accumulation importante en concentration de P.

La vitesse initiale de la réaction **dans le régime d'état stationnaire** (pas transitoire) satisfait la condition d'irréversibilité et elle est définie par la mesure de  $v$  à  $t = 0$ .

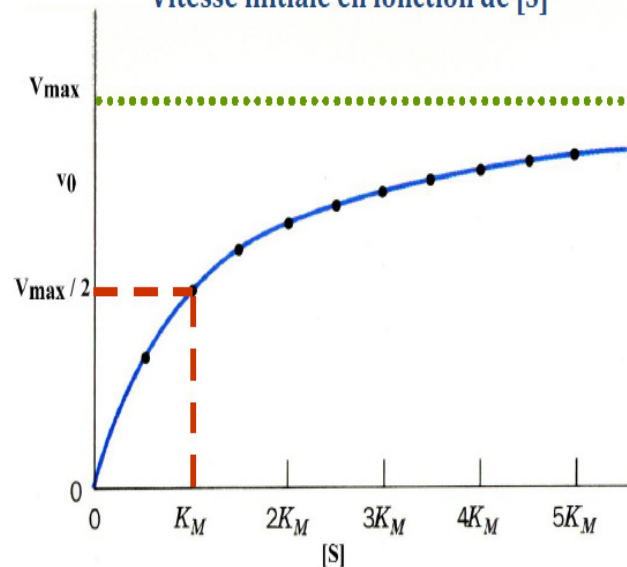
Donc,  $v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0}$ , représente la vitesse initiale et qui s'exprime en fonction des quantités expérimentalement mesurable  $[E]_T$  et  $[S]$ .

L'utilisation de la vitesse initiale, mesurée dans l'intervalle correspondant au moins que 10% consommation de substrat, minimise non seulement des facteurs potentiels de complications comme la réaction réversible, mais également l'inhibition de l'enzyme par produit et l'inactivation progressive de l'enzyme.

### Signification de la constante de Michaelis

L'équation de Michaelis-Menten est l'équation de base des cinétiques enzymatiques est connue mathématiquement comme une courbe hyperbolique. Selon l'équation, lorsque  $[S]$  est égale à  $K_M$ ,  $v = V_{max}/2$ . C'est donc dire que  $K_M$  est égal à la concentration du substrat à laquelle le taux de catalyse est la moitié du taux maximal. La valeur du  $K_M$  varie avec les enzymes, la nature du substrat, le tissu où l'enzyme a été isolé, le pH, la température, etc.

### Vitesse initiale en fonction de [S]



Variation de la vitesse initiale,  $v_0$ , en fonction de la concentration en substrat pour une réaction Michaelis-Menten simple. Les points sont disposés à des intervalles de  $0.5K_M$  pour des concentrations en substrat comprises entre  $0.5 - 5K_M$ .

La constante de Michaelis peut être exprimée comme

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

Le  $K_M$  peut être égal à la constante de dissociation  $K_S$ , **si et seulement si** la dissociation du complexe ES en E et S est beaucoup plus rapide que la formation de E et P. Dans ces conditions,  $k_{-1} \gg k_2$  et  $K_M \approx K_S$ . Ceci permet de mesurer l'affinité de l'enzyme pour le substrat; un  $K_M$  élevé signifie une faible association alors qu'un  $K_M$  faible indique une forte association.

Les valeurs  $K_M$  sont souvent proches des concentrations physiologiques de leur substrat. Le taux de catalyse étant extrêmement sensible à la concentration du substrat près du  $K_M$ , une variation mineure dans la concentration du substrat peut changer toute une voie métabolique.

#### Analyse des données cinétiques.

À haute concentration de S,  $v_0 \approx V_{MAX}$  mais même à  $[S] = 10K_M$ ,  $v_0 = 0.91V_{MAX}$ . Donc aujourd'hui des analyses non linéaires sont utilisées pour obtenir des estimations expérimentales de  $V_{MAX}$  et  $K_M$ .

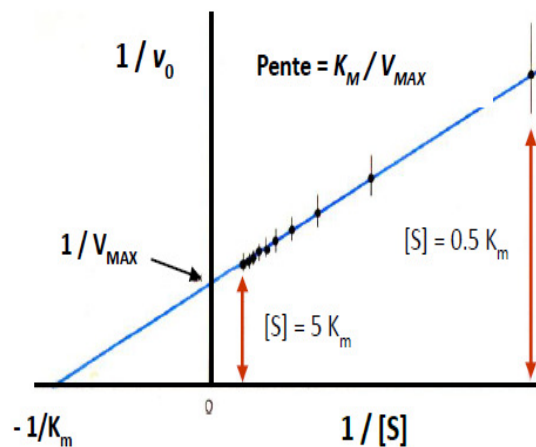
Traditionnellement les estimées des valeurs cinétiques,  $V_{max}$  et  $K_M$  ont été obtenues à partir d'une méthode proposée par Lineweaver et Burk et connue sous ce

nom. Une courbe de  $v$  en fonction de  $[S]$  permet de définir les valeurs de  $K_M$  et  $V_{max}$ , directement en utilisant l'équation réciproque et tracer une courbe  $1/v$  en fonction de  $1/[S]$ . Une ligne droite sera obtenue.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{MAX}} + \frac{K_M}{V_{MAX} [S]}$$

À partir de cette courbe, comme indiqué, nous pouvons directement calculer les valeurs de  $V_{max}$  sur l'axe et de  $K_M$  à partir de la pente de la courbe.

### Représentation en doubles réciproques (Lineweaver-Burk)



Les points sont obtenus à partir des données de la figure précédente. Notez l'effet important de petites erreurs pour  $[S]$  faibles ( $1/[S]$  élevées) et le rapprochement des points pour  $[S]$  élevées. Barres d'erreurs de  $\pm 0.05 V_{MAX}$

### Mesure de la constante catalytique et de l'efficacité enzymatique.

- a) Les paramètres cinétiques d'un enzyme permettent de mesurer son efficacité catalytique. Nous pouvons d'abord définir la constante catalytique ( $k_{cat}$ , ou le «**turnover number**») comme étant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par chaque site actif, quand l'enzyme est saturé.

$$k_{cat} = \frac{V_{MAX}}{[E]_T}$$

La valeur de  $k_{cat}$  ( $s^{-1}$ ) =  $k_2$ , dans les réactions possédant un mécanisme de type Michaelis-Menten. La valeur inverse  $1/k_{cat}$  représente le temps requis pour convertir 1 molécule de substrat en produit.

- b) L'efficacité enzymatique peut être calculée lorsque l'enzyme est non-saturé,  $[S] \ll K_M$  c'est-à-dire quand beaucoup de sites sont libres. Dans les conditions physiologiques, il est très rare qu'un enzyme soit saturé, puisque la concentration du substrat est généralement inférieure au  $K_M$  de l'enzyme. Dans les conditions où la

concentration d'enzyme libre est à peu près égale à la concentration d'enzyme total,  $[E] \approx [E]_T$ , on a

$$v \approx \frac{k_{cat}}{K_M} [S][E]_T \approx \frac{k_{cat}}{K_M} [S][E]$$

Le taux de catalyse dépend donc de la valeur de  $k_{cat}/K_M$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ), qui représente une pseudo constante bimoléculaire et il mesure l'efficacité catalytique de l'enzyme ou sa spécificité.

**Est-ce qu'il y a une limite à l'efficacité catalytique ?** De l'équation ci-haut on a :

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Cette quantité est maximale si  $k_2 \gg k_{-1}$ , ça veut dire que la formation des produits obtenus à partir d'ES est très vite par rapport à la décomposition de ES en substrat et enzyme et on obtient  $k_{cat} / K_M \approx k_1$ .

Cette constante de deuxième ordre  $k_1$  ne peut pas dépasser la fréquence avec laquelle le substrat combine avec l'enzyme.

La limite de la valeur  $k_1$  est la vitesse de diffusion avec laquelle le substrat rencontre l'enzyme.

Certains enzymes ont atteint une efficacité catalytique tellement grande qu'elles ne sont que limitées par le coefficient de diffusion des molécules ( $10^8$  à  $10^9 M^{-1}s^{-1}$ ). Le tableau sur la prochaine page montre les valeurs de  $K_M$ ,  $k_{cat}$ , et  $k_{cat}/K_M$  pour plusieurs enzymes et substrats. À savoir, la catalase, l'acétylcholinestérase, la fumarase, et possiblement l'anhydrase carbonique remplissent cette condition et ont donc pratiquement atteint la perfection catalytique.

C'est donc dire que l'enzyme combine avec le substrat aussitôt qu'il le rencontre. Vu que le site actif de l'enzyme est une surface restreinte comment le substrat est-il guidé au site actif reste une question à laquelle la réponse n'est pas encore claire.



Enzyme	Substrat	$K_M$ (M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$\frac{k_{cat}}{K_M}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	$9.5 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^8$
Anhydrase carbonique	$CO_2$	$1.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$
	$HCO_3^-$	$2.6 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$H_2O_2$	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^8$
Chymotrypsine	Ester éthylique de N-Acétyleglycine	$4.4 \times 10^{-1}$	$5.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
	Ester éthylique de N-Acétylevaline	$8.8 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-1}$	1.9
	Ester éthylique de N-Acétyletyrosine	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^2$	$2.9 \times 10^5$
Fumarase	Fumarate	$5.0 \times 10^{-6}$	$8.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^8$
	Malate	$2.5 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^7$
Uréase	Urée	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$

À noter en cas des substrats pour chymotrypsine, l'enzyme démontre la meilleure efficacité envers le substrat de l'ester éthylique de N-acétyltyrosine.