

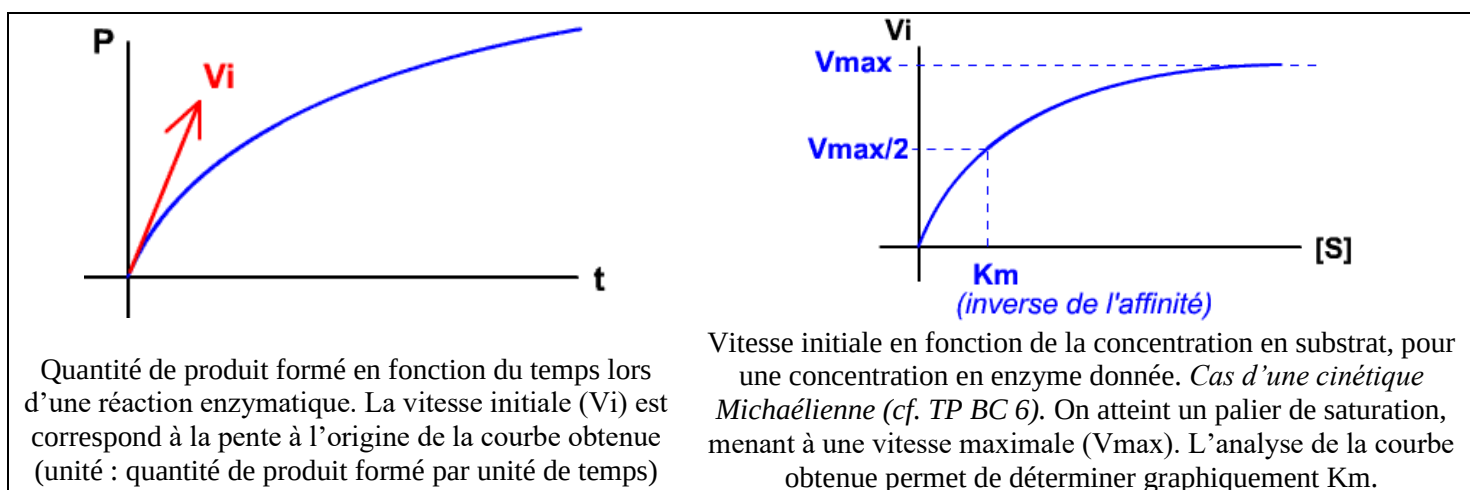
**TP SV
E**
ENZYMOLOGIE
 COURS :SV-E-3, SV-D-2.4 TP : SV-D2


Une enzyme est un **catalyseur biologique**, ou biocatalyseur. Un catalyseur est un **agent chimique qui accélère une réaction chimique, sans être transformé en fin de réaction**. On distingue les catalyseurs « chimiques » en général métalliques (zinc, platine, etc.) et les biocatalyseurs (essentiellement les enzymes¹).



D'un point de thermodynamique, l'enzyme **accélère la réaction, sans modifier l'équilibre** : la vitesse réactionnelle est accélérée, mais le ΔrG est inchangé.

D'un point de vue cinétique, une enzyme peut être caractérisée par deux paramètres principaux : son **K_m** et son **V_{max}**. Le V_{max} correspond à la vitesse maximale de la réaction (pour une concentration en enzyme donnée) ; on mesure dans tous les cas des vitesses initiales (V_i), c'est-à-dire la vitesse de la réaction en début de mesure. Le K_m correspond à la concentration de substrat conduisant à une vitesse initiale de réaction de la moitié du V_{max} : cette valeur dépend de l'enzyme (et est indépendante de la concentration en enzyme). Le K_m est une valeur inverse de **l'affinité** de l'enzyme pour son substrat : plus l'affinité est élevée, plus le K_m est faible, et vice-versa.



L'objectif de ce TP est de déterminer expérimentalement les paramètres d'une enzyme, et d'envisager l'influence de plusieurs paramètres sur la catalyse enzymatique.

Pour cela, nous nous baserons en particulier sur l'exemple de la peroxydase, ce qui nous permettra de mettre en œuvre une étude expérimentale assistée par ordinateur (ExAO).

Programme officiel :

- Réaliser le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :
 - Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale
 - Construction d'une courbe $v_i = f([S_0])$ et linéarisation en double inverse
 - Détermination de K_M, V_{max} et de l'efficacité catalytique

Seul le suivi expérimental d'une cinétique michaelienne est réalisé en TP

Compétences :

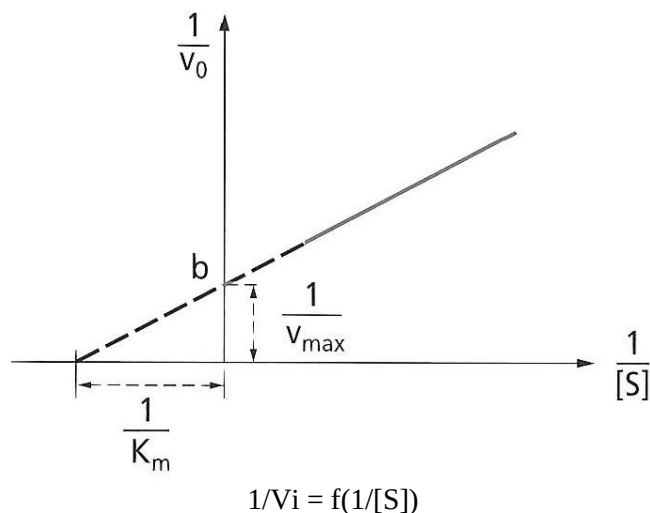
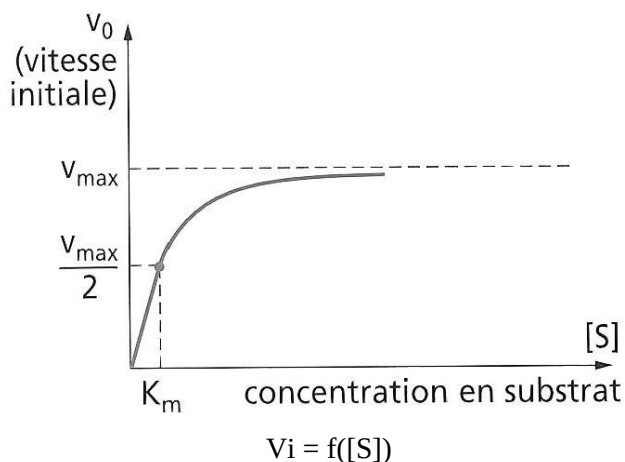
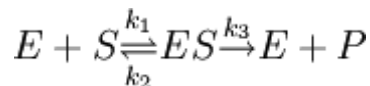
- Comparer les effets des inhibiteurs compétitifs et non compétitifs sur les paramètres d'une enzyme michaelienne
- Réaliser et exploiter le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :
 - Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale
 - Construction d'une courbe $v_i = f([S_0])$ et linéarisation en double inverse
 - Détermination de K_M, V_{max} et de l'efficacité catalytique

¹ Les enzymes sont des **biocatalyseurs protéiques**. Il faut noter cependant que ces enzymes possèdent parfois un groupement **prosthétique** (= non protéique) qui intervient pendant l'acte catalytique. De même, il a été démontré que certains ARN peuvent réaliser une catalyse : on parle alors de **ribozyme**. En particulier, la catalyse de la formation de la liaison peptidique par le ribosome est réalisée par un ARNr constitutif de la grande sous-unité. Cette existence des ribozymes est particulièrement intéressante d'un point de vue évolutif, un certain nombre de théories actuelles proposant une apparition de la vie basée uniquement sur l'ARN (comme support de l'information génétique et comme biocatalyseur) : c'est le « monde ARN » (**RNA World**).

² L'enzyme n'est pas transformée à l'issue de la réaction. Toutefois, il est à rappeler que l'enzyme **participe à la réaction** (c'est d'ailleurs ce qui permet la catalyse) : Elle est donc modifiée au cours de la réaction, mais ces modifications la « ramènent » à son état initial, à la fin des réactions chimiques composant le mécanisme enzymatique.

Plan du TP :**1. Paramètres cinétiques d'une activité enzymatique**1.1. Rappel : équation de Michaelis-Menten (voir TP SV-D2)1.2. Signification des paramètres cinétiques⇒ K_m et affinité⇒ V_{max}, k_{cat} : efficacité catalytique et turn-over⇒ Efficacité globale (pour information)1.3. Enzymes michaeliennes et inhibiteurs⇒ L'inhibition compétitive IC⇒ L'inhibition non compétitive INC**2. Etude cinétique d'une réaction enzymatique**2.1. Enzyme et réaction catalysée2.2. Principe de la mesure2.3. Protocole expérimental2.4. Mesures à effectuer2.5. Exploitation des résultats2.6. Méthode : Utilisation d'un tableau pour déterminer les paramètres cinétiques2.7. Autre exemple de manipulation réalisable en TP (et donc aux concours !)**3. Exercices : étude d'inhibiteurs michaeliens****Travail préparatoire :**

📖 Lecture attentive et apprentissage des paramètres cinétiques (partie 1)

1. Paramètres cinétiques d'une activité enzymatique1.1. Rappel : équation de Michaelis-Menten (voir TP SV-D2)

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

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

1.2. Signification des paramètres cinétiques⇒ K_m et affinité

1/K_m représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ordres de grandeur (exemples) : un K_m de 10⁻² mol.L⁻¹ correspond à des enzymes très actives avec une forte affinité (ex. : peroxydases), alors qu'un K_m de 10⁶ mol.L⁻¹ est retrouvé dans des enzymes peu actives (ex. : protéinases).

⇒ V_{max} , k_{cat} : efficacité catalytique et turn-over

V_{max} représente l'efficacité catalytique de l'enzyme. Cette vitesse est proportionnelle à la concentration enzymatique :

$$V_{max} = k_{cat} [E]_{totale}$$

La constante catalytique **k_{cat}** traduit l'efficacité de la catalyse par l'enzyme, ou **turn-over**. Il est homogène à un temps⁻¹, et donne le nombre de molécules de substrats transformées en produit par unité de temps, par enzyme, et à saturation ($V = V_{max}$).

⇒ Efficacité globale (pour information)

L'**efficacité globale** de l'enzyme peut être évaluée par le rapport **K_{cat}/K_m** . Plus ce rapport est élevé, plus l'enzyme est efficace.

Exemples de K_m

Enzyme	Substrat	K_m (mM)
Catalase	H_2O_2	25
Hexokinase (cerveau)	ATP	0,4
	D-Glucose	0,05
	D-Fructose	1,5
Anhydrase carbonique	HCO_3^-	9
Chymotrypsine	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2,5
β -Galactosidase	D-Lactose	4,0
Thréonine déshydratase	L-Thréonine	5,0

Exemples de k_{cat} (turn-over)

Turnover* (k_{cat}) de quelques enzymes		
Enzyme	Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)
Catalase	H_2O_2	40 000 000
Anhydrase carbonique	HCO_3^-	400 000
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	140 000
β -Lactamase	Benzylpénicilline	2 000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protéine (ATPase)	ATP	0,4

* Nombre de molécules de substrat transformées par seconde et par molécule d'enzyme.

Exemples d'enzymes avec une très grande efficacité globale

Enzymes pour lesquels k_{cat}/K_m est proche de la limite de diffusion (10^8 à 10^9 M ⁻¹ s ⁻¹)				
Enzyme	Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (M)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Anhydrase carbonique	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1,1	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malate	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
Triose phosphate isomérase	Glycéraldéhyde-3-phosphate	$4,3 \times 10^3$	$4,7 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^8$
β -Lactamase	Benzylpénicilline	$2,0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

1.3. Enzymes michaeliennes et inhibiteurs

Certaines molécules, les effecteurs, peuvent moduler l'activité enzymatique. En particulier, les inhibiteurs peuvent diminuer la vitesse ou l'affinité de l'enzyme. Ces effecteurs ont un rôle fondamental dans les mécanismes de contrôle des systèmes biologiques.

De même, nombre de médicaments ou de toxines agissent en inhibant certaines enzymes, inhibant de fait des voies du métabolisme cellulaire ou de l'organisme.

L'inhibition peut être soit réversible, soit irréversible (*hors programme BCPST*). Pour information, les inhibiteurs irréversibles peuvent correspondre à molécules qui se dissocient très lentement de l'enzyme cible. C'est le cas des gaz neurotoxiques par exemple. Cas aussi de la pénicilline, qui se fixe à la place du substrat de l'enzyme formant les liaisons peptidiques des peptidoglycane de la paroi bactérienne, et établissant une liaison covalente avec l'enzyme.

⇒ L'inhibition compétitive IC

Les inhibiteurs **compétitifs** agissent en se fixant **sur le site actif de l'enzyme**, du fait d'une **similitude de structure** avec le **substrat**. Il se forme donc un complexe EI, qui empêche la fixation du substrat : **l'affinité de l'enzyme pour le substrat est diminuée**.

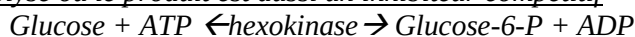
Ceci est confirmé par les études cinétiques : $K_m' > K_m$, donc $\text{affinité}' < \text{affinité}$.

Il y a en fait une **compétition** au niveau du site de fixation entre le substrat et l'inhibiteur : il est donc possible de **contrer cette inhibition en augmentant la concentration en substrat**.

On peut définir un K_i , correspondant à l'affinité de l'enzyme pour son inhibiteur :

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

Exemple : réaction de la glycolyse où le produit est aussi un inhibiteur compétitif



Le G6P permet d'éviter sa trop grande accumulation si la glycolyse, derrière, n'est pas suffisamment active. Il s'agit ici d'un **rétrocontrôle négatif** (situation courante dans la régulation des enzymes).

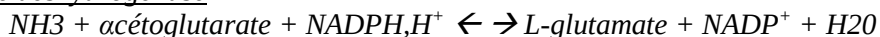
⇒ L'inhibition non compétitive INC

Un autre type d'inhibition est l'inhibition **non compétitive**. Dans ce cas de figure, l'inhibiteur ne se fixe pas au niveau du site actif, mais **sur un autre site** de l'enzyme : il induit un **changement de conformation** qui se traduit au final par une **diminution du turnover** de l'enzyme → la **$V_{\max}$ diminue**, sans que K_m ne soit modifié.

L'augmentation de la concentration en substrat ne permet pas de contrer cette inhibition.

Remarque : l'inhibition non compétitive réversible est en réalité un phénomène rare... elle est souvent plutôt irréversible, ou alors incompétitive (baisse de K_m ET de $V_{\max}$ – hors programme BCPST).

Exemple : glutamate déshydrogénase



Réaction capitale, car fixation de l'azote minérale (ammoniac) et synthèse d'un acide aminé. Réalisée dans le chloroplaste des plantes (autotrophie pour le N). Une substance extraite du saule, le salicylate, exerce une inhibition non compétitive de cette enzyme.

⇒ Traduction graphique des inhibitions michaéliennes

En résumé :

Inhibition	K_m	$V_{\max}$ (turn-over)
Compétitive	↑ Augmenté	= Inchangée
Non-compétitive	= Inchangé	↓ Diminuée

