

ENZYMOLOGIE

MODULE: BIOCHIMIE II

AGB1

Pr Rabia Bouslamti

2019-2020

Plan

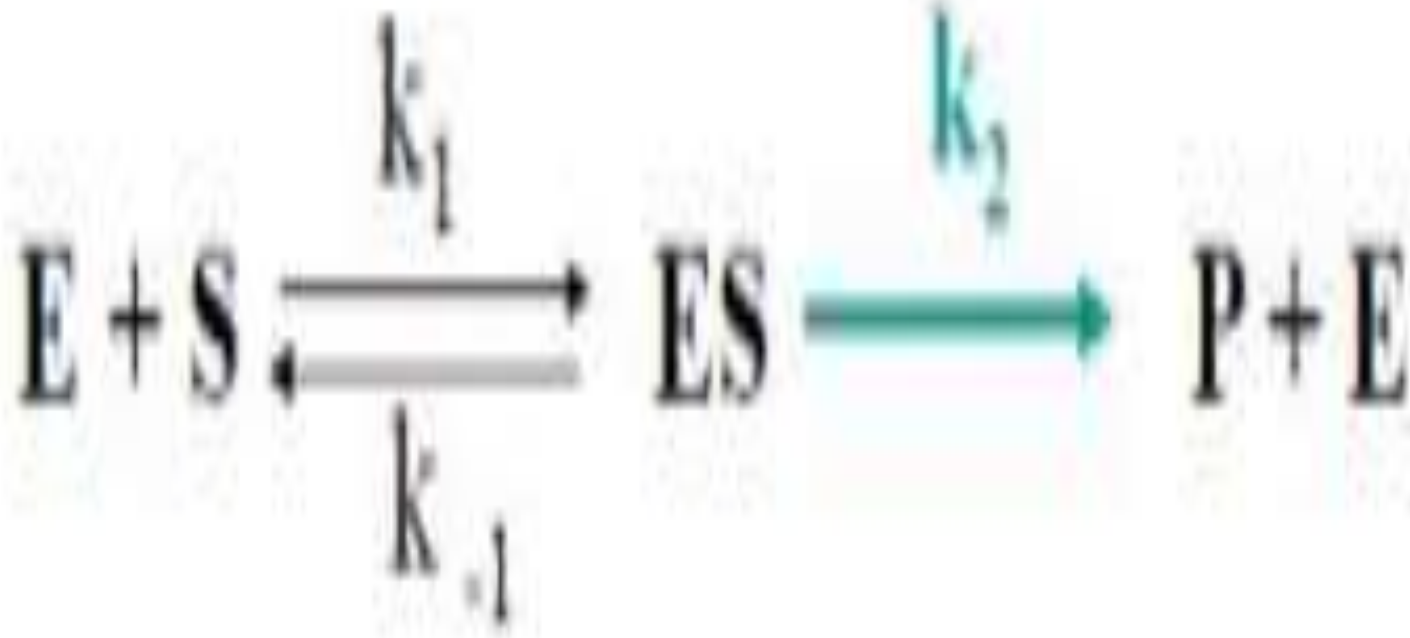
Cinétique enzymatique

- Calcul de l'équation de Michaélis-Menton
- Détermination graphique de K_m et V_{max}
(représentation V en fonction de S selon Michaélis-Menton)
- Représentation en double inverse
- Représentation de Eadie-Hofstee
- Représentation de Hanes et Woolf

Inhibiteurs enzymatiques

- Définition
- Inhibiteurs irréversibles et réversibles

Equation de Michaélis



- E : Concentration en enzyme libre
- S : Concentration en substrat
- ES: Complexe de Michaélis – Menton
- $K_1;K_2...$: Constantes de vitesse
- Et : Enzyme totale (enzyme libre + enzyme sous forme de ES)

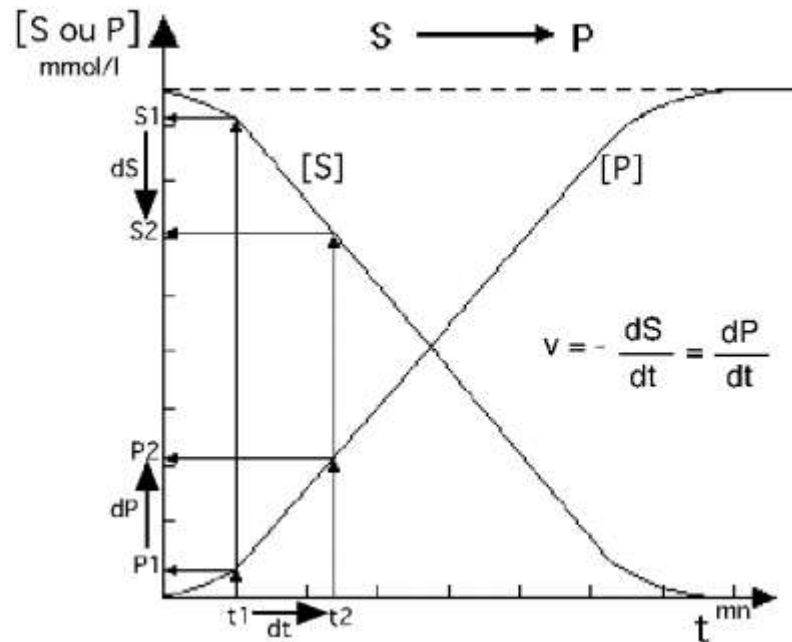
Rappel

Vitesse de la réaction

Elle est définie par la quantité de substrat transformé (dS) par unité de temps (dt) ou la quantité de produit apparu (dP) par unité de temps (dt).

Vitesse d'une réaction enzymatique (Rappel)

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



Calcul de l'équation de Michaélis

Equation de Michaélis-Menten (1913)

- La concentration de produit doit être négligeable par rapport à celle du substrat pour éviter la réaction inverse (la réaction inverse ne rentre pas dans le calcul de l'équation de Michaélis)
- La **concentration** du complexe **ES** doit être **constante** au cours du temps.

Phase stationnaire : la concentration en ES constante

Vitesse de formation de ES = vitesse de disparition de ES

$$V = -dS/dt = dP/dt$$

$$V = K_2 [ES]$$

$$[ES]_{cst} : V_f ES = V_d ES$$

$$V_f ES = k_1 [E] [S]$$

$$V_d ES = k_{-1}[ES] + k_2 [ES]$$

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

$$k_1 [E] [S] = [ES] (k_2 + k_{-1}) \Rightarrow [E] [S] / [ES] = (k_2 + k_{-1}) / k_1$$

on définit

$$K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1$$

K_m : constante de Michaelis

$$[E][S] / [ES] = K_m$$

Soit : [Et] la concentration totale de l'enzyme. La concentration libre de l'enzyme sera : $[E] = [Et] - [ES]$

L'expression de la constante de Michaélis devient :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([Et] - [ES])[S]}{[ES]}$$

$$= \left(\frac{[Et][S]}{[ES]} \right) - \left(\frac{[ES][S]}{[ES]} \right) = \left(\frac{[Et][S]}{[ES]} \right) - [S]$$

$$\Rightarrow K_m + [S] = \left(\frac{[Et][S]}{[ES]} \right)$$

$$[ES] = \frac{[Et][S]}{K_m + [S]}$$

Or, la vitesse de la réaction enzymatique est égale à :

$$V = k_2 [ES], \text{ en remplaçant } [ES] :$$

$$V = k_2 [Et][S] / (K_m + [S])$$

Si on utilise une concentration illimitée de S par rapport à Enzyme, on peut considérer que $ES = E_t$ et

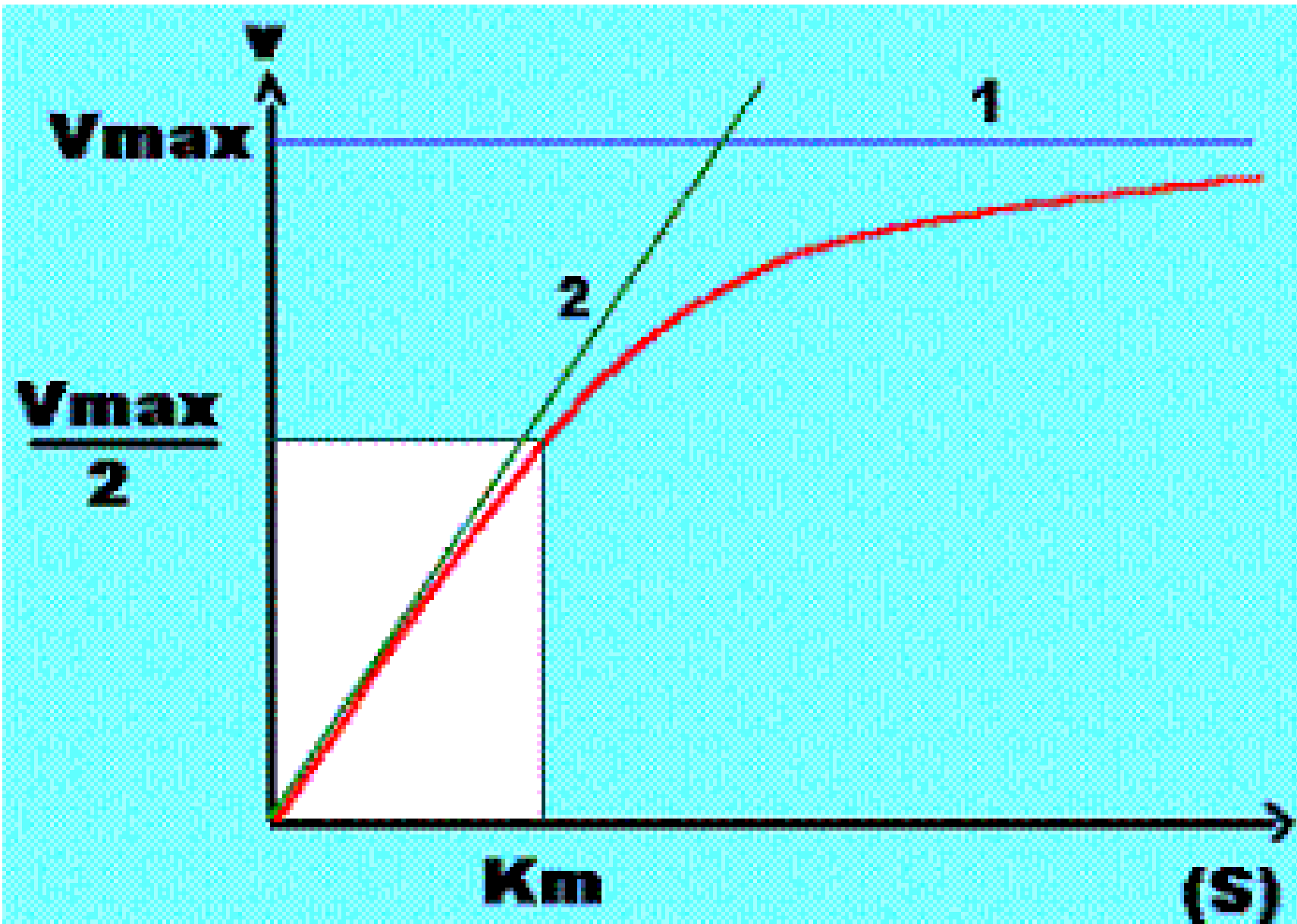
$$V_{max} = k_2 [E_t]$$

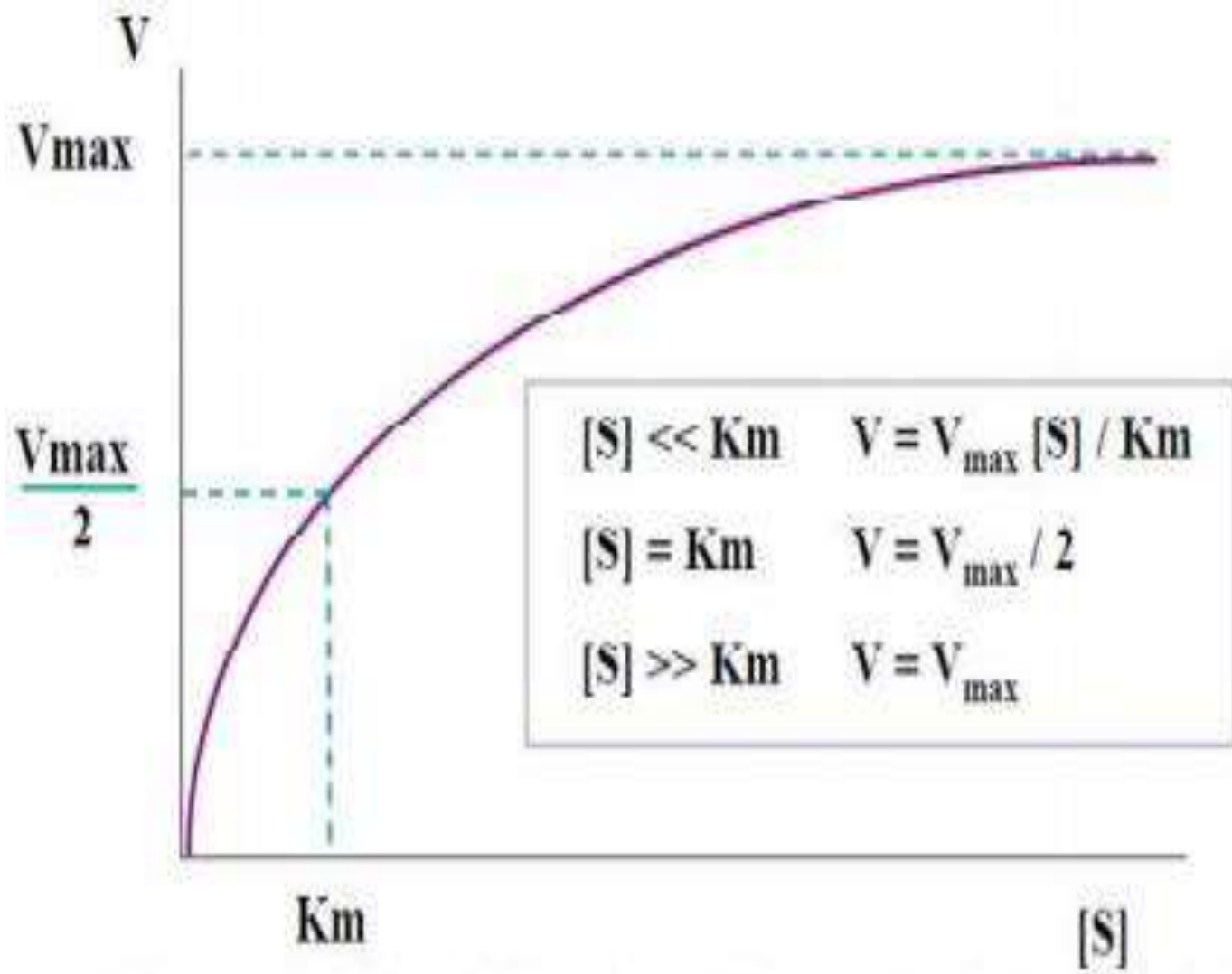
d'où on tire :

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

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

Equation de Michaélis Menten





Km:

Km est égale à la concentration de substrat à laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum Vmax.

$$V = V_{\max}/2, \text{ alors } [S] = K_m.$$

La constante de Michaelis Km est une caractéristique fondamentale très utile d'un couple enzyme-substrat.

Km est une fonction complexe des constantes k1, k-1 et k2.

Km a l'unité de la concentration en substrat (mole/L)

Affinité de l'enzyme :

Km est l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Plus la valeur de Km est basse, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée.

Km/affinité

Km bas :

- l'enzyme a une grande affinité pour substrat
- l'enzyme devient donc rapidement saturé
- l'enzyme est donc peu influencé par les changements de concentrations.

Km élevé :

- l'enzyme a une faible affinité pour son substrat
- l'enzyme devient donc saturé seulement à de fortes concentrations
- l'enzyme est donc susceptible aux changements de concentrations.

RMQ

Vitesse initiale

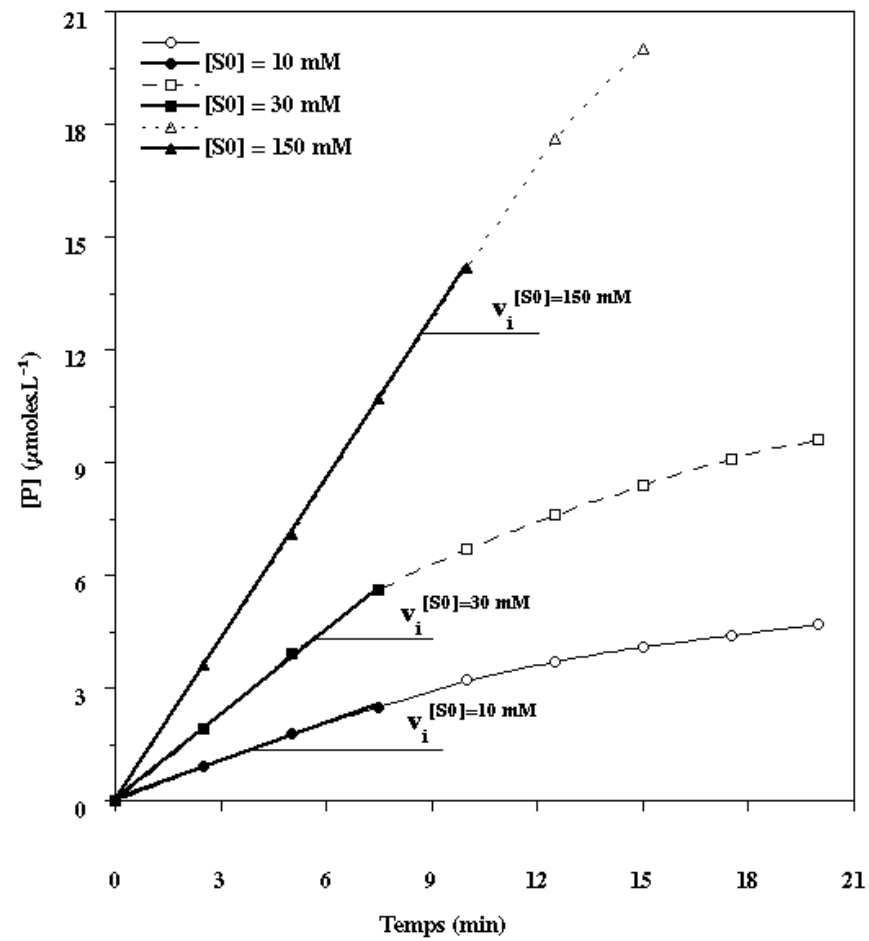
Pour chaque cinétique, on trace une tangente, à partir de $t = 0$, correspondant à la plus grande portion "linéaire" (cette estimation visuelle dépend de l'expérimentateur).

La pente de la tangente à l'origine de la cinétique ($d[P] / dt$) s'appelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique, v_i .

cette vitesse initiale ($d[P]/dt = -d[S]/dt$) est quasi-constante pendant une certaine durée

Dans l'exemple ci-contre, les valeurs de v_i sont :

| [S] (mM) | v_i ($\mu\text{moles.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) |
|----------|--|
| 10 | 0,34 |
| 30 | 0,75 |
| 150 | 1,42 |



Représentation en double inverse

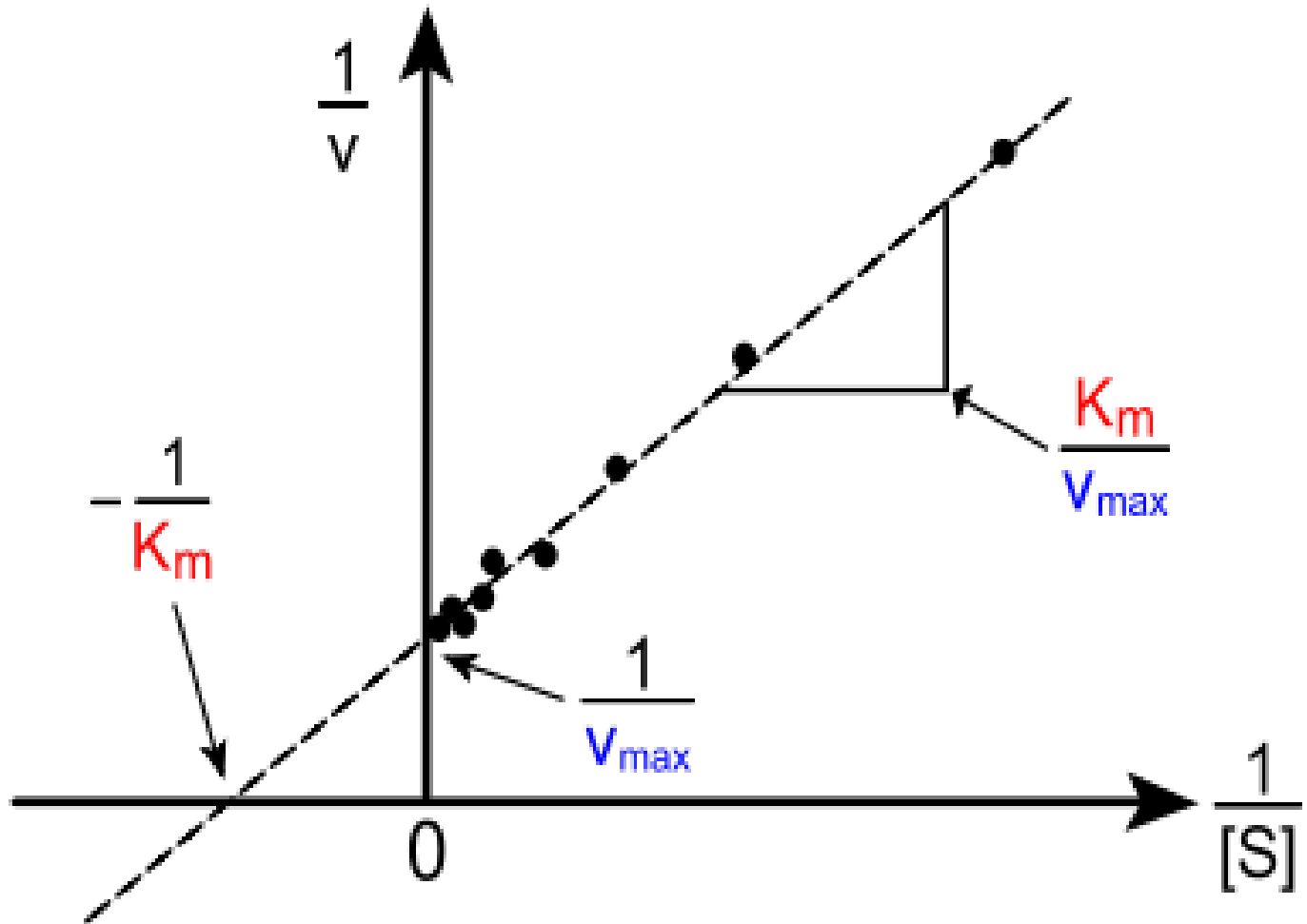
Selon lineweaver Burk

$1/V$ en fonction de $1/S$

- A partir de l'équation de Michaélis –Menton
- Donner l'équation dite en double inverse
 $1/V$ en fonction de $1/S$
- Tracer cette courbe et donner les points
d'intersection avec l'axe des x et l'axe des y

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M}$$

Représentation en double inverse



Points d'intersection

Axe des x : $-1/Km$

Axe des Y : $1/V_{max}$

Pente : Km/V_{max}

Avantages

- On obtient une droite (Linéarité de la courbe de Michaélis)
- On Détermine avec précision les paramètres de la cinétique enzymatique (K_m et V_{max})
- Nécessite moins de points expérimentaux

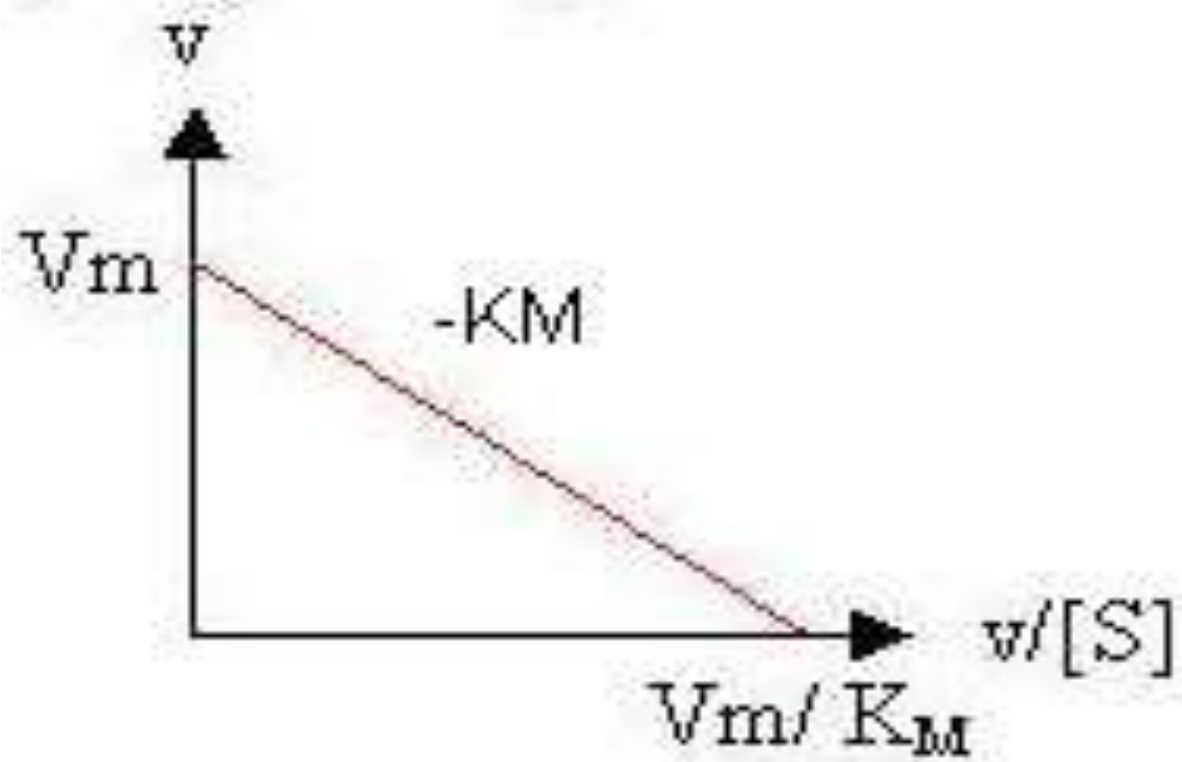
Représentation de Eadie-Hofstee

La représentation de Eadie-Hofstee

$$V = f(V/[S])$$

Démontrer que:

$$V = -K_m \times V/[S] + V_m$$



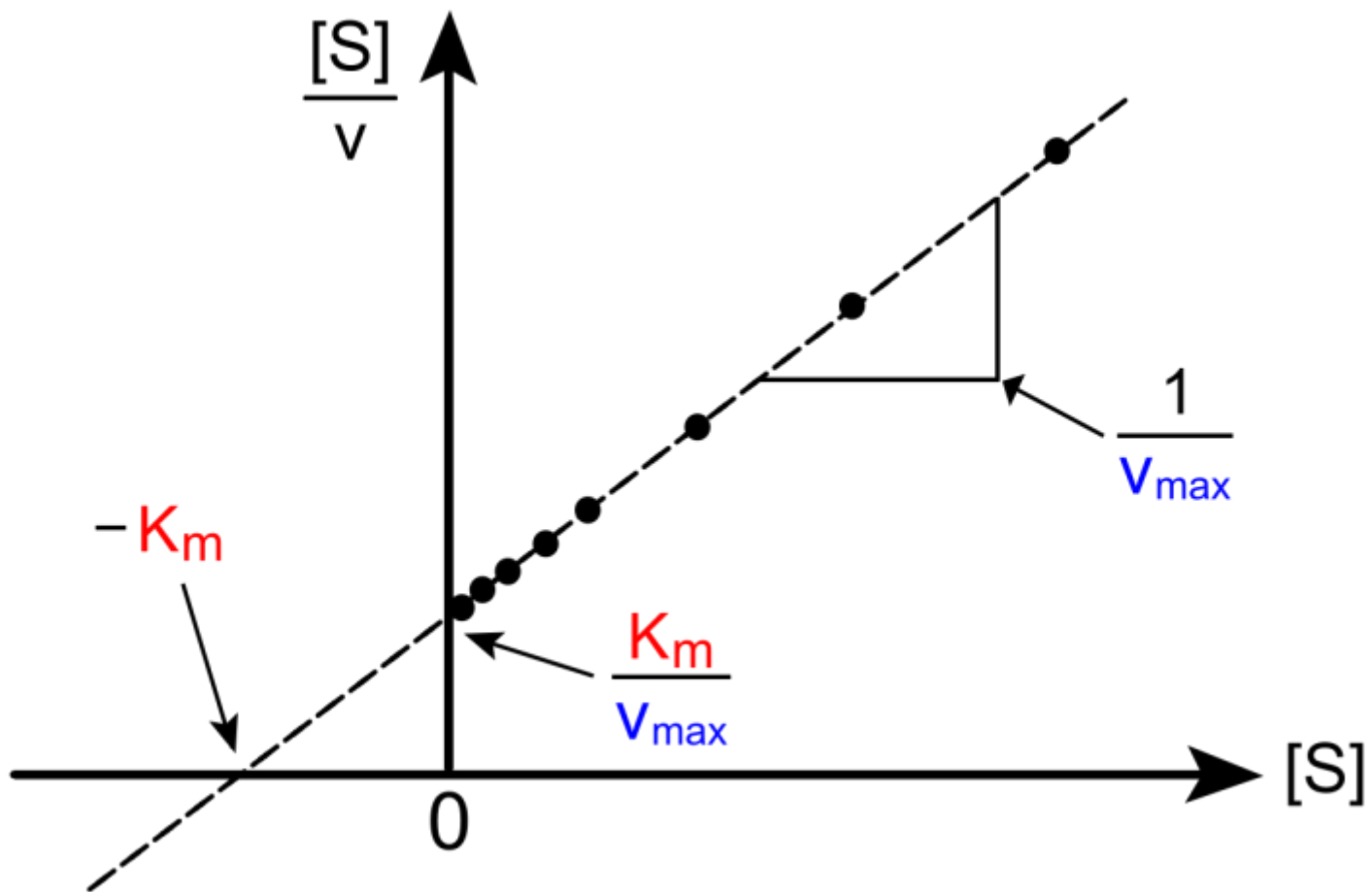
Points d'intersection

- Y: V_m
- X: V_m/K_m
- Pente : $-K_m$

Représentation de Hanes et Woolf

La représentation de Hanes et Woolf

- $[S]/v = f([S])$
- $[S]/v = 1/V_m \times [S] + K_M/V_m$



Inhibiteurs enzymatiques

- Définition
- Inhibition irréversible
- Inhibition réversible

inhibiteurs compétitifs IC

inhibiteurs non compétitifs INC

inhibiteurs incompétitifs IIC

Définition

L'inhibiteur est une molécule qui se lie à l'enzyme mais **ne subit pas de transformation**, il entraîne **une diminution de l'activité enzymatique**.

L' inhibiteur est une substance qui inactive l' enzyme

Il existe deux principaux types d'inhibition:

- **Inhibition réversible** des enzymes: l'activité enzymatique peut être retrouvée en enlevant l'inhibiteur
- **Inhibition irréversible** des enzymes: l'inhibiteur lie l'enzyme de manière covalente, inactivant ce dernier de façon irréversible.

Inhibiteurs irréversibles

Ils se lient de façon covalente au site actif de l'enzyme entraînant une inhibition définitive

ex: La pénicilline est un inhibiteur d'une enzyme (la transpeptidase) intervenant dans la synthèse du peptidoglycane, composant de la paroi des bactéries.

Inhibition enzymatique irréversible

pénicilline

- Paroi bactérienne:
 - Peptidoglycane
 - La pénicilline empêche la formation d'une liaison entre le tétrapeptide et le pont pentaGly;

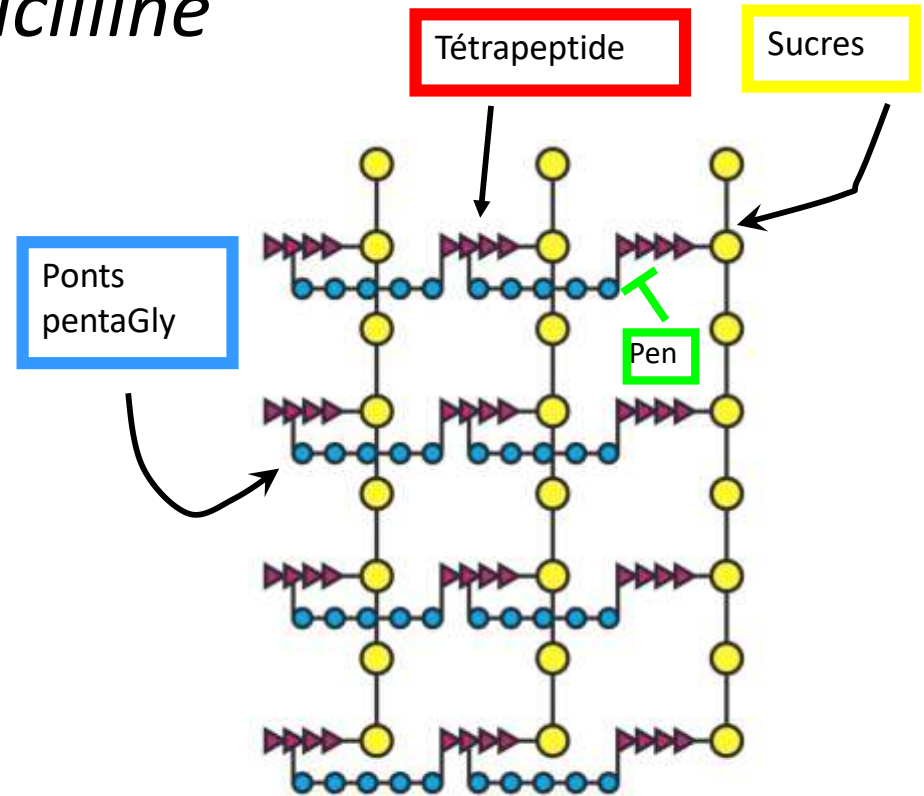


Figure 8-31
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Structure de la paroi
bactérienne

Les inhibiteurs réversibles

Trois types d'inhibiteurs :

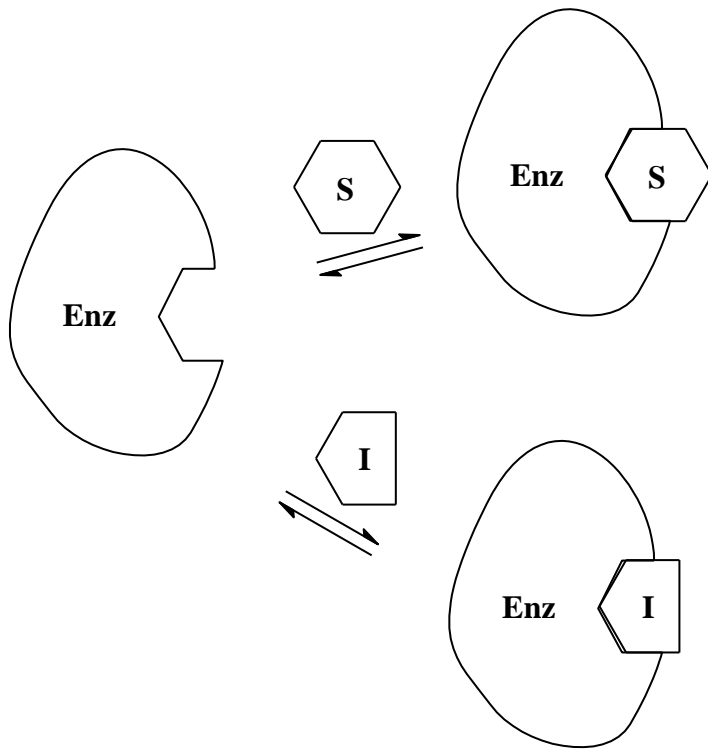
Les **i**nhibiteurs **c**ompétitifs : **IC**

non **c**ompetitifs : **INC**

in**c**ompetitifs : **IIC**

Inhibition compétitive IC

la liaison de l'inhibiteur, à l'enzyme libre, empêche la liaison du substrat



Inhibition compétitive IC

- Type d'inhibition le plus rencontrée
- Les IC sont des analogues structuraux du substrat S (se fixent sur le même site actif que le substrat)
- Inhibiteur et S sont en compétition pour le même site de liaison sur l'enzyme: le site actif

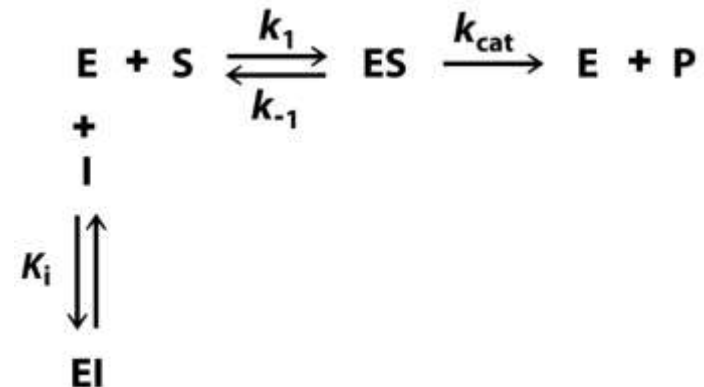
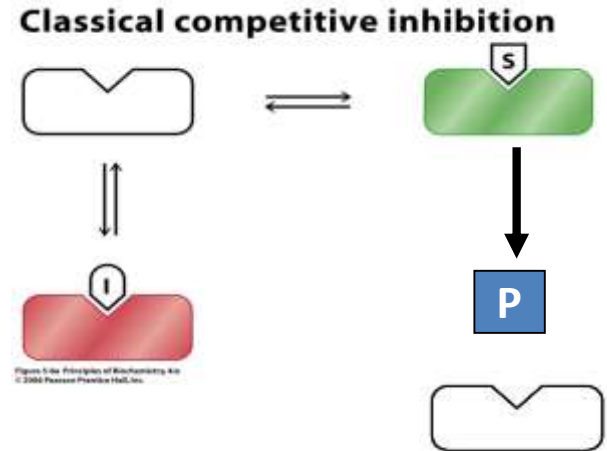
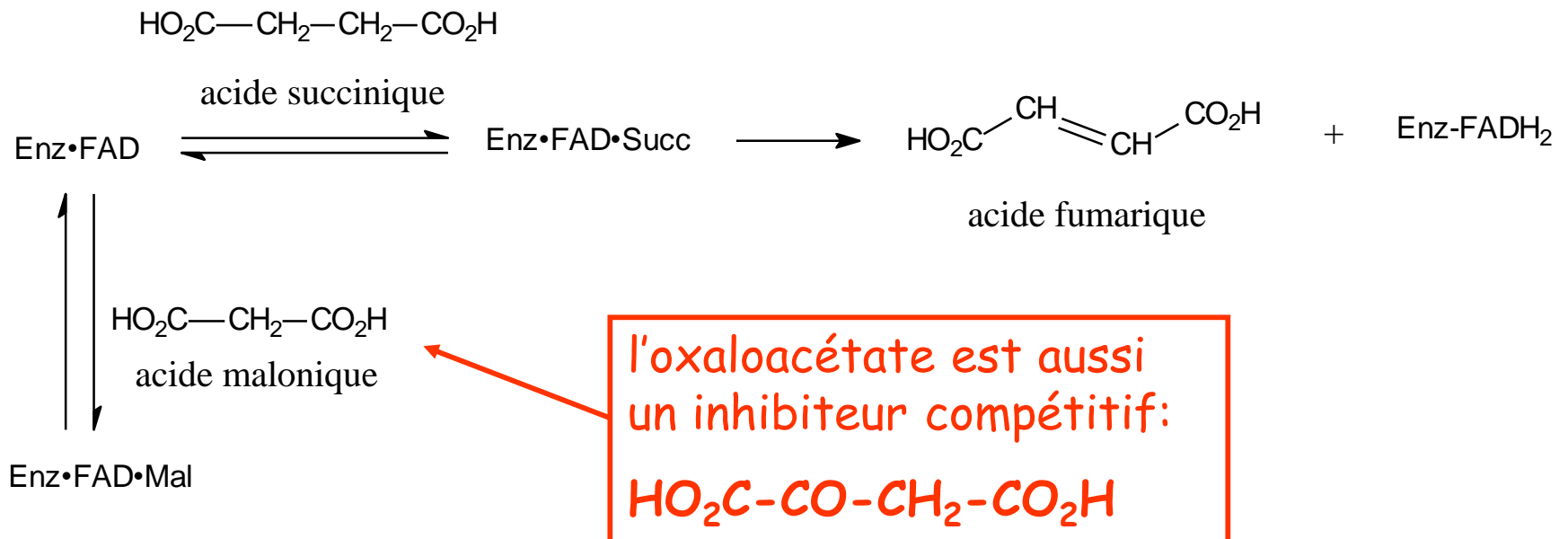


Figure 5-9a Principles of Biochemistry, 6e
© 2008 Pearson Prentice Hall, Inc.

Exemple de IC

- l'acide malonique et oxaloacétate ressemblent à l'acide succinique et inhibent la déshydrogénase de succinate lors de la réaction :



Exemple de IC

S: acide succinique

P: acide fumarique

Enz.FAD

IC: acide malonique et oxaloacétate

