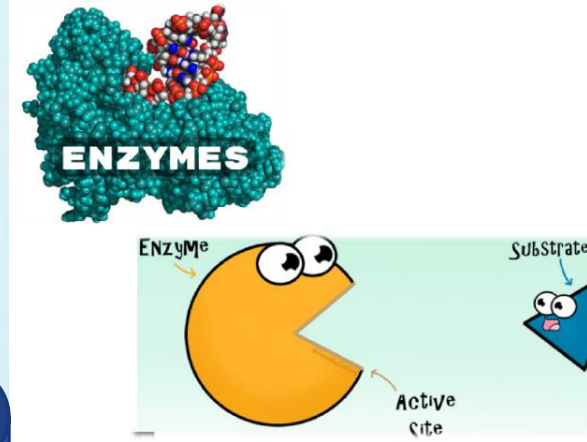


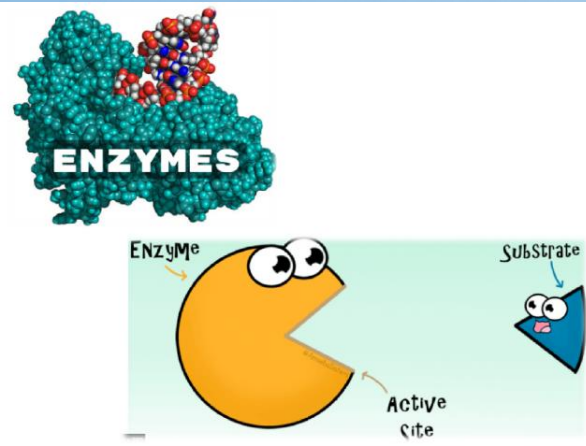
Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biotechnologie végétale



## Chapitre IV: Méthodes Enzymatiques

1<sup>ère</sup> Année Master Biotechnologies Végétales

2023/2024



# Introduction

- Les organismes vivants sont le siège d'innombrables réactions biochimiques.
- Ces réactions constituent le métabolisme c'est à dire l'anabolisme et le catabolisme d'un grand nombre de molécules biologiques.
- Ces réactions s'effectuent dans des conditions physiologiques où, normalement, elles seraient très lente.
- Si elles ont lieu, c'est par ce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques: **Les enzymes**

## Exemple



Cette réaction est si lente qu'une solution aqueuse de saccharose peut demeurer pratiquement stable pendant des années.

Pour accélérer la réaction



Catalyseur chimique

Milieu acide et à chaud

Catalyseur enzymatique

Invertase

# I. Définition des enzymes

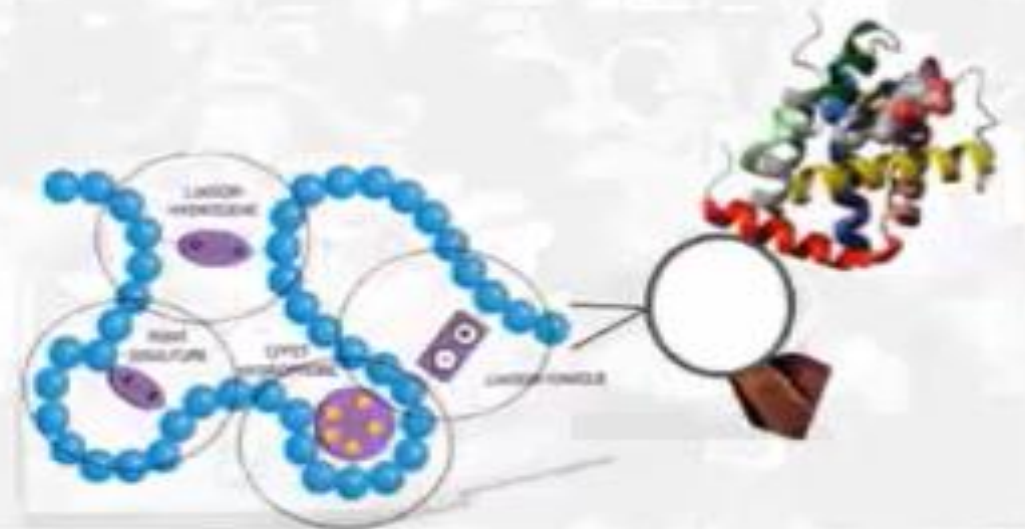
Une enzyme est une protéine capable de catalyser des réactions biochimiques dans les organismes vivants, ceci dit:

- Des **catalyseurs**, c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très petites, elles **augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat**. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée;
- Une enzyme donnée est **spécifique** d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux;
- Les enzymes **sont synthétisées par des êtres vivants (des biocatalyseurs)**. Cette synthèse est déterminée génétiquement : sa conservation dans le génome est favorisée par le besoin qu'éprouve cet être vivant de faire cette réaction.

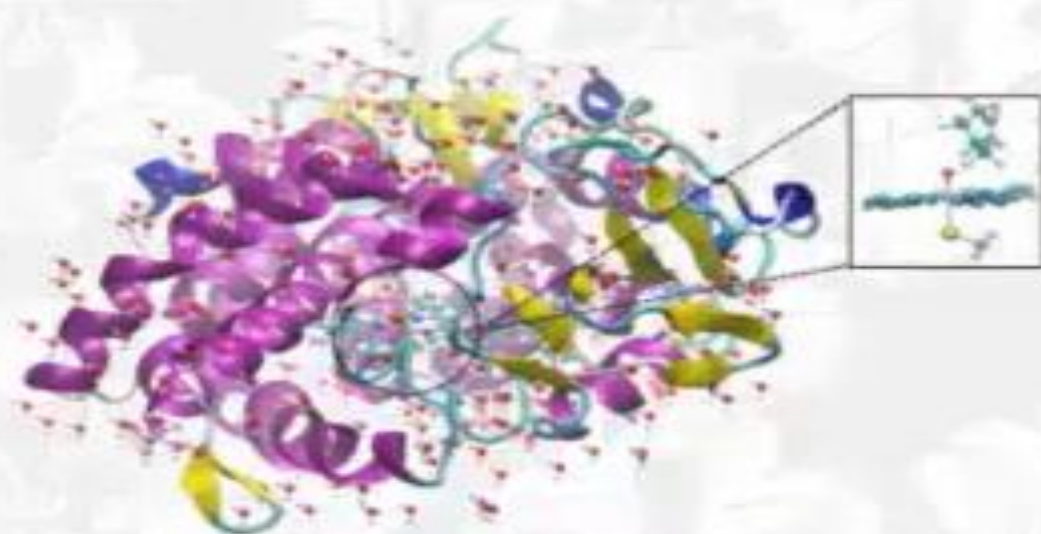
## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 1. Structure des enzymes

Les protéines natives se replient dans une conformation tertiaire fonctionnelle unique d'où l'acquisition de leur activité biologique, dans notre cas, il s'agit de la catalyse enzymatique.



Structure tertiaire des protéines



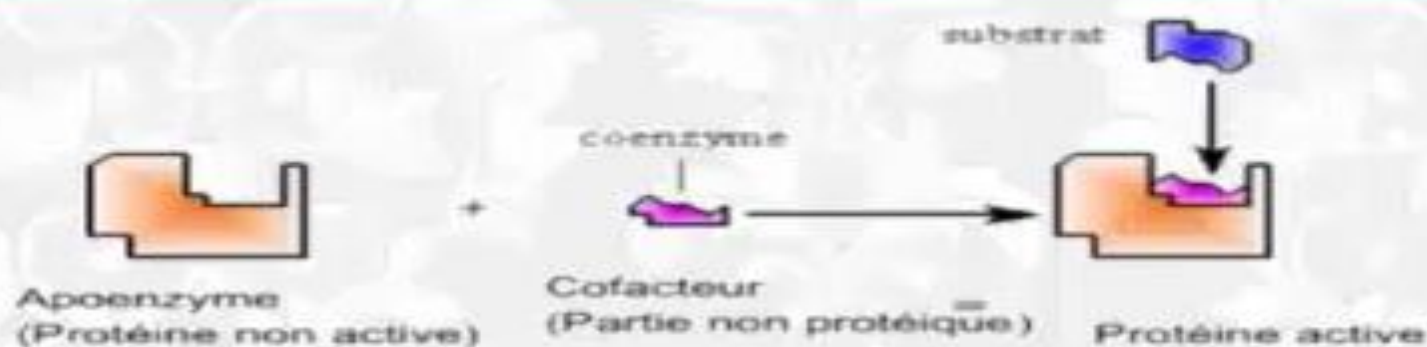
Structure quaternaire des protéines

## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 1. Structure des enzymes

En plus de la partie protéique (**apoenzyme**) certaines enzymes ont besoin d'un **cofacteur** pour fonctionner (partie non protéique).

Un cofacteur: molécule non protéique, **quand il existe**, est indispensable à l'activité enzymatique.



Les cofacteurs peuvent être :

- Des ions métalliques (molécules de nature inorganique) comme le  $Mg^{2+}$  ou le  $Zn^{2+}$
- Des molécules de nature organique : qu'on appelle **des coenzymes** (la plupart des vitamines).

## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 1. Structure des enzymes

En se basant sur la nature de **liaison coenzyme-enzyme**, on distingue :

#### Les coenzymes libres

Lorsque les coenzymes sont liés à l'enzyme par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée.

Ils sont appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.

Dans ce cas la coenzyme porte le nom de cosubstrat.

#### Les coenzymes liés

Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons covalentes. Ces coenzymes sont appelés coenzymes liés parce qu'ils ne se dissocient pas de l'enzyme.

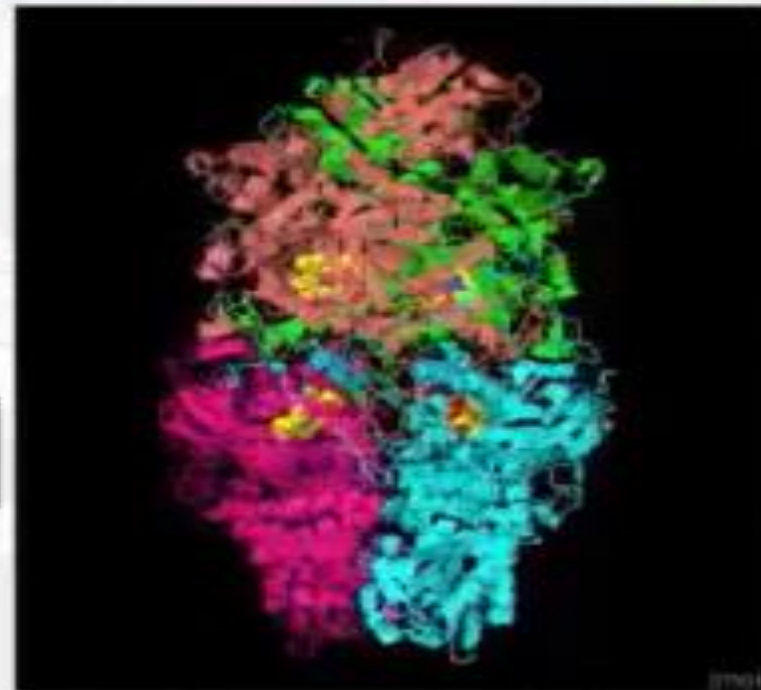
Dans ce cas la coenzyme porte le nom de groupement prosthétique.

## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 2. Caractéristiques des enzymes

#### a. Elles agissent à très faible dose :

Une molécule de catalase peut hydrolyser plus que 5 millions de molécules d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en une min dans des conditions de pH et de température physiologiques.



**Le substrat** : est une molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

**Le produit** : est une molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.



## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 2. Caractéristiques des enzymes

#### c. La double spécificité

Les enzymes présentent une double spécificité, une spécificité vis-à-vis du substrat et une spécificité vis-à-vis de la réaction catalysée.

- **Spécificité de substrat** : l'enzyme n'agit que sur un substrat ou une classe de substrat;
- **Spécificité d'action** : l'enzyme ne catalyse, pour un substrat donné, qu'un seul type de réaction.

## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 2. Caractéristiques des enzymes

#### Spécificité de substrat:

**Spécificité large:** L'enzyme peut agir avec un grand nombre de composés possédant un seul caractère structural commun.

**Exp.** Hexokinase, enzyme qui catalyse la phosphorylation d'hexoses, comme le D-glucose, le D-mannose et le D-fructose

**Spécificité étroite:** L'enzyme ne lie qu'un seul substrat.

**Exp** La Glucose-6-phosphatase, une hydrolase qui catalyse la réaction d'hydrolyse du glucose-6-phosphate en D-glucose avec libération de phosphate inorganique

## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 2. Caractéristiques des enzymes

#### d. L'activité enzymatique est modulable (contrôlable)

L'activité d'une enzyme est contrôlée par des **modulateurs** :

- Les **activateurs** augmentent l'activité.
- Les **inhibiteurs** la diminuent.

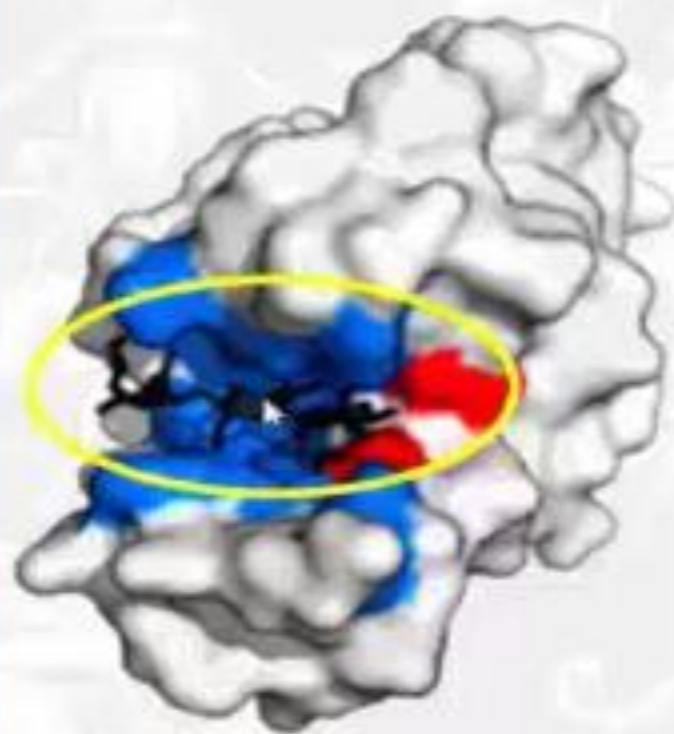
Ce qui permet d'ajuster la vitesse globale d'un métabolisme au besoin cellulaire

## II. Structure et Caractéristiques des enzymes

### 3. Le site actif des enzymes

Le site actif est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, situé dans la zone hydrophobe de la protéine. Il s'agit généralement d'une petite zone de l'enzyme.

C'est la région de l'enzyme qui permet la reconnaissance et la fixation de substrat, il est aussi le siège de la catalyse.



## VII. Dosage enzymatique

- **L'activité enzymatique** se mesure par la vitesse de la réaction qui consiste à évaluer la quantité de S transformé ou de P apparu par unité de temps dans des conditions opératoires bien déterminées.

# VI. Dosage enzymatique

## 1. Les Conditions opératoires du dosage

- L'enzyme étudiée doit être en quantité limitante;
- Le substrat doit être utilisé à concentration saturante  $S \geq 10 K_m$  (pour atteindre la  $V_{Max}$ ).
  - Pour une concentration de  $S = 10 K_m$ , la  $V_i = 91 \% V_m$
  - Pour une concentration de  $S = 100 K_m$ , la  $V_i = 99 \% V_m$
- Le **pH optimum** de l'enzyme: le pH est fixé par un tampon pour éviter toute variation du pH ;
- La **température optimale** de l'enzyme: fixer de manière précise est constante ;
- La **force ionique** est fixée par un tampon ;
- Les besoins de l'enzyme en **activateurs ou cofacteurs** (Ajout en quantité non limitante si nécessaire).

## VI. Dosage enzymatique

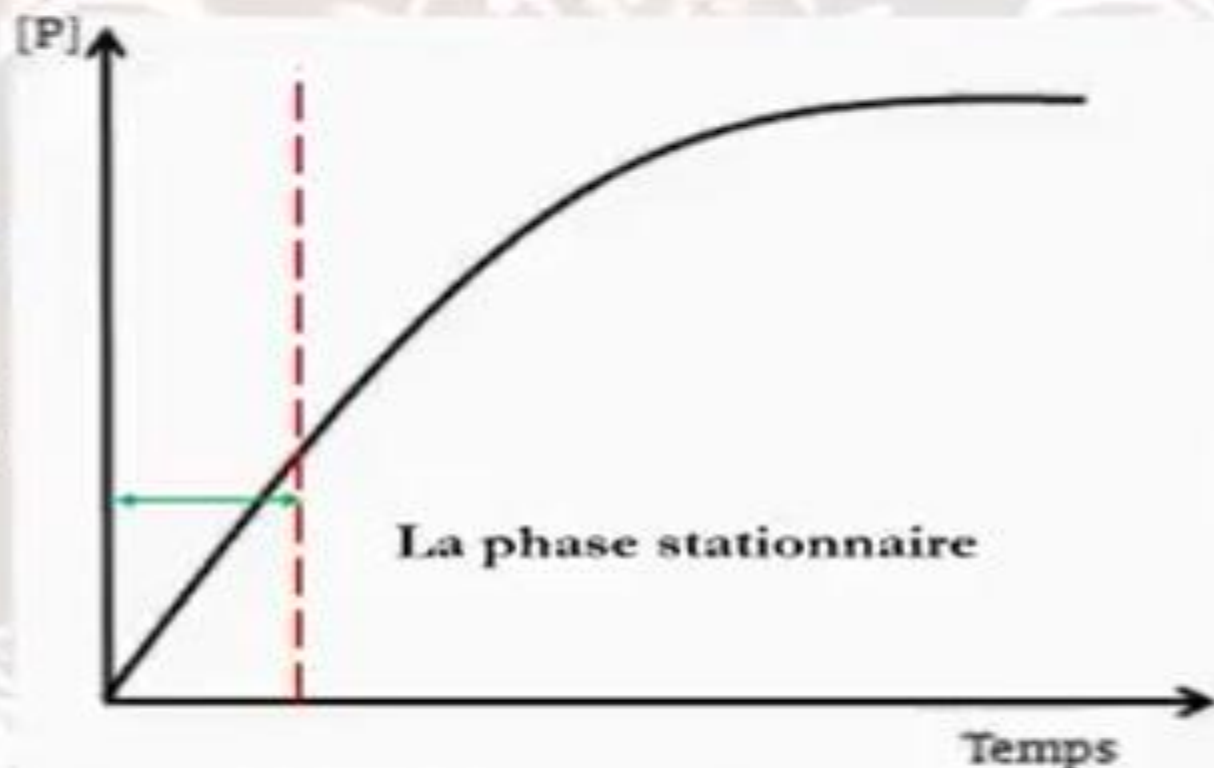
### 2. Méthodes de mesure

#### 2.1. Méthodes en deux points : cinétiques en un temps fixé

- Il consiste à mesurer la quantité de produit apparue ou de substrat disparue au bout d'un temps fixé.
- La durée de la réaction doit être mesurée avec une extrême précision.

Il y aura deux points :

- **un point  $t=0$**  : est celui où la réaction est déclenchée ;
- **Et un point  $t$**  : c'est le point déterminé à un temps expérimental ( $t$ ), il doit correspondre à la phase stationnaire.



## VI. Dosage enzymatique

### 2. Méthodes de mesure

#### 2.1. Méthodes en deux points : cinétiques en un temps fixé

- Lorsque la durée d'incubation s'est écoulée, il est nécessaire d'arrêter la réaction soit par une méthode physique ou chimique.
- La concentration en S restant ou en P formé dans le milieu réactionnel est dosée par la suite par une technique appropriée (spectrophotométrie, par exemple).

Etant en condition saturante en substrat:

$$La\ V_{i\ max} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$$

Dans le cas d'un dosage spectrométrique

- on ne trace pas la [P] formé ou la [S] disparu en fonction du temps
- mais on trace l'absorbance obtenue en fonction du temps

Il suffit d'appliquant la loi de Beer Lambert :

$$DO = \epsilon \cdot l \cdot C \longrightarrow C = DO / \epsilon \cdot l$$

Avec :

- $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ;
- $C$  : concentration molaire dans la cuve de S ou P mesuré ;
- $l$  : trajet optique (épaisseur de la cuve en cm).

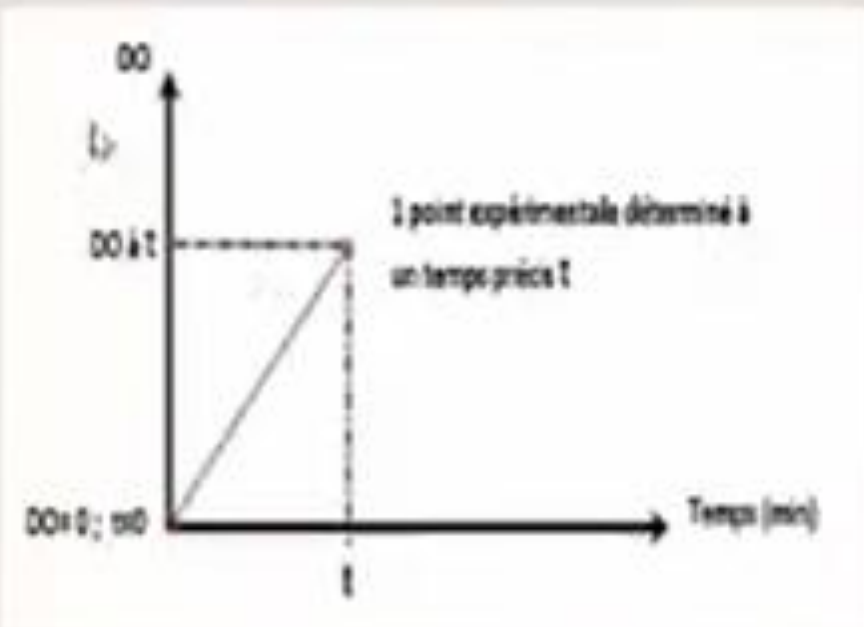
Donc l'activité enzymatique sera égale à :

$$(AE) = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot l}$$

$$\text{Unité : } \frac{1}{\text{min}} \cdot M \cdot cm \cdot cm^{-1}$$

En mol/l/min

Mais par litre de milieu réactionnel



Si l'enzyme est diluée dans le milieu réactionnel

Avec:

$V_t$  : le volume total du milieu réactionnel après dilution

$V_e$  : le volume de solution contenant l'enzyme,

On obtient :

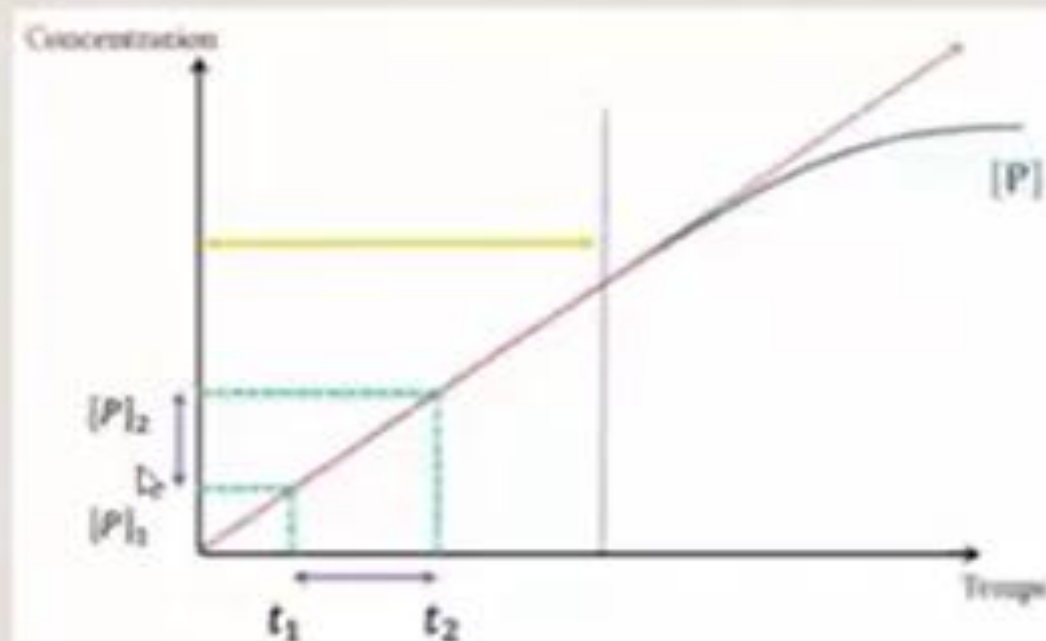
$$(AE) = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{V_t}{V_e} \quad \text{mol//min/l}$$

## 2. Méthodes de mesure

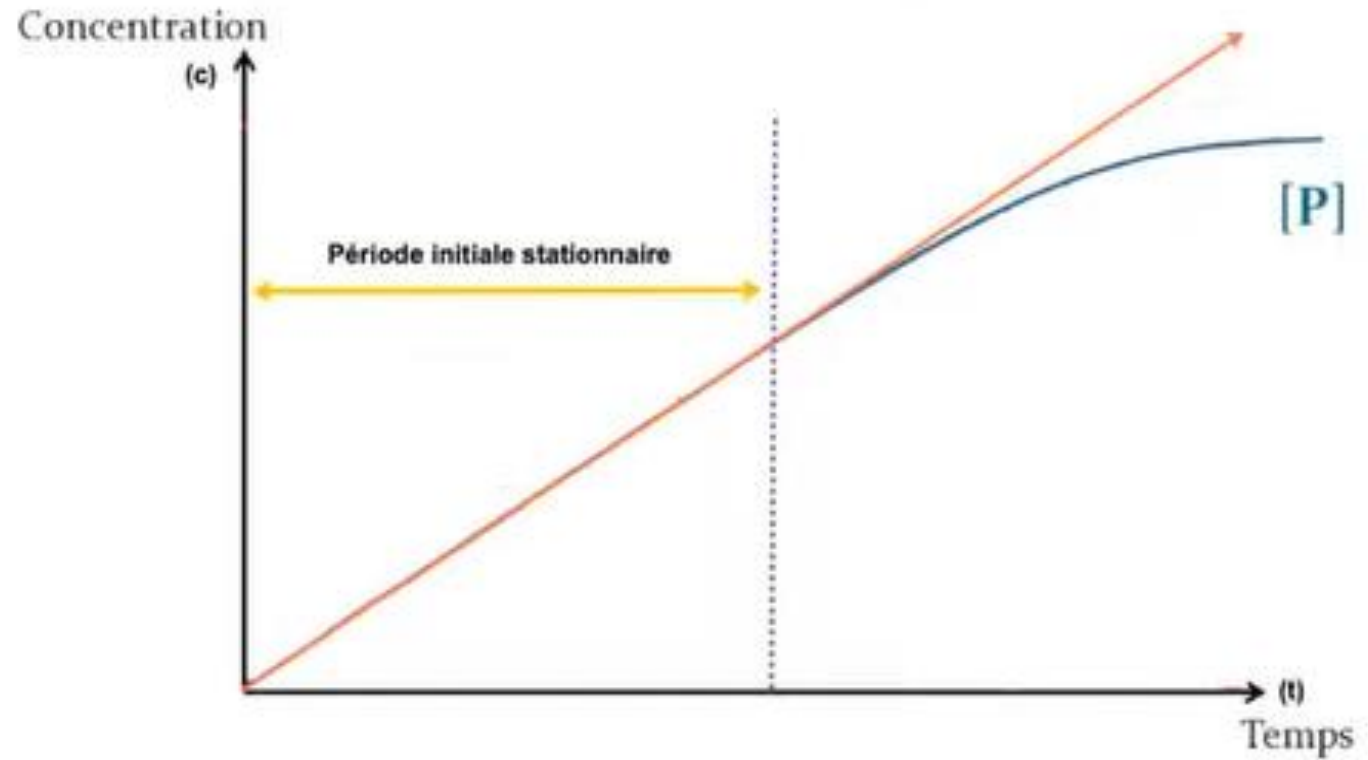
### 2.2. Méthode cinétique

- Cette méthode consiste à suivre en continu l'apparition du produit ou la disparition du substrat généralement par spectrophotométrie pendant une phase suffisamment longue pour obtenir une cinétique satisfaisante.
- Elle peut fournir des valeurs en continu ou à des intervalles de temps relativement courts
- Les méthodes en cinétique sont préférentiellement utilisées si les conditions le permettent, car elles permettent **de s'assurer que la réaction se déroule dans la partie linéaire initiale** (phase stationnaire).

- On va déterminer de la même façon la vitesse initiale maximale de la réaction en mesurant la pente pendant la phase stationnaire.

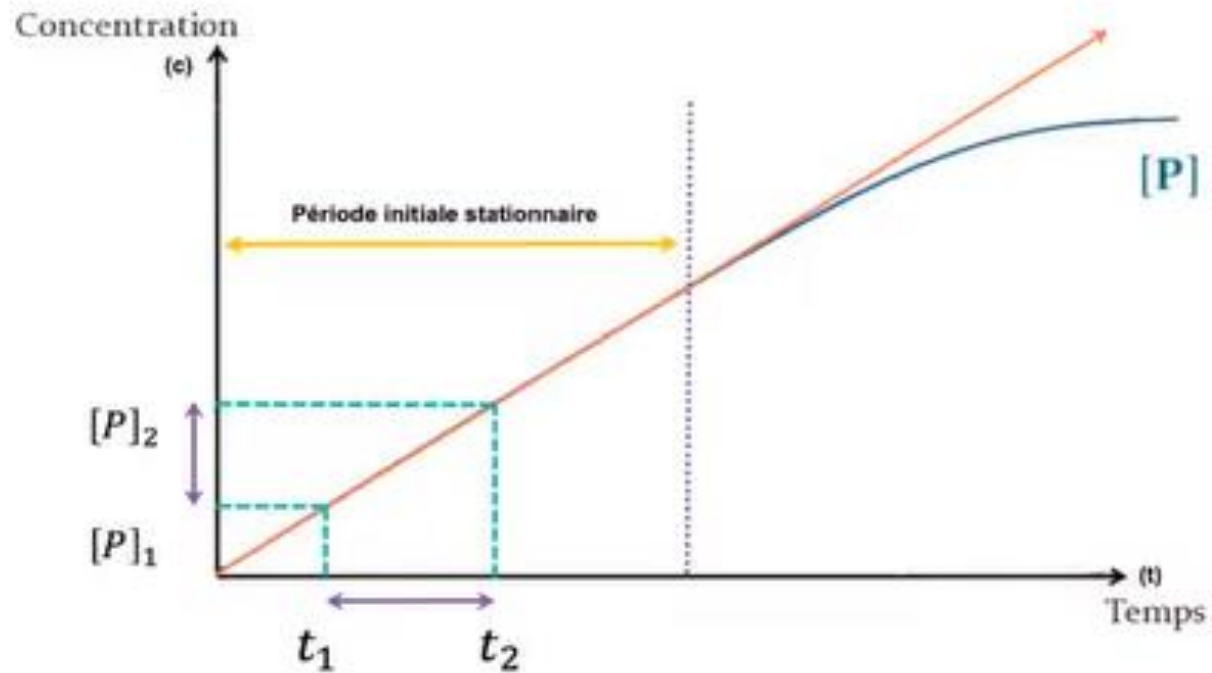


## La méthode cinétique



- On réalise
  - Un suivi de mesure de l'apparition du produit généralement
  - Par spectrophotométrie
  - Pendant une phase suffisamment longue pour obtenir une cinétique satisfaisante.
  - On n'attendra pas que tout le substrat soit consommé puisque seul nous intéresse la période stationnaire.
- Ici la mesure du temps est peu précise

## La méthode cinétique



- Ainsi

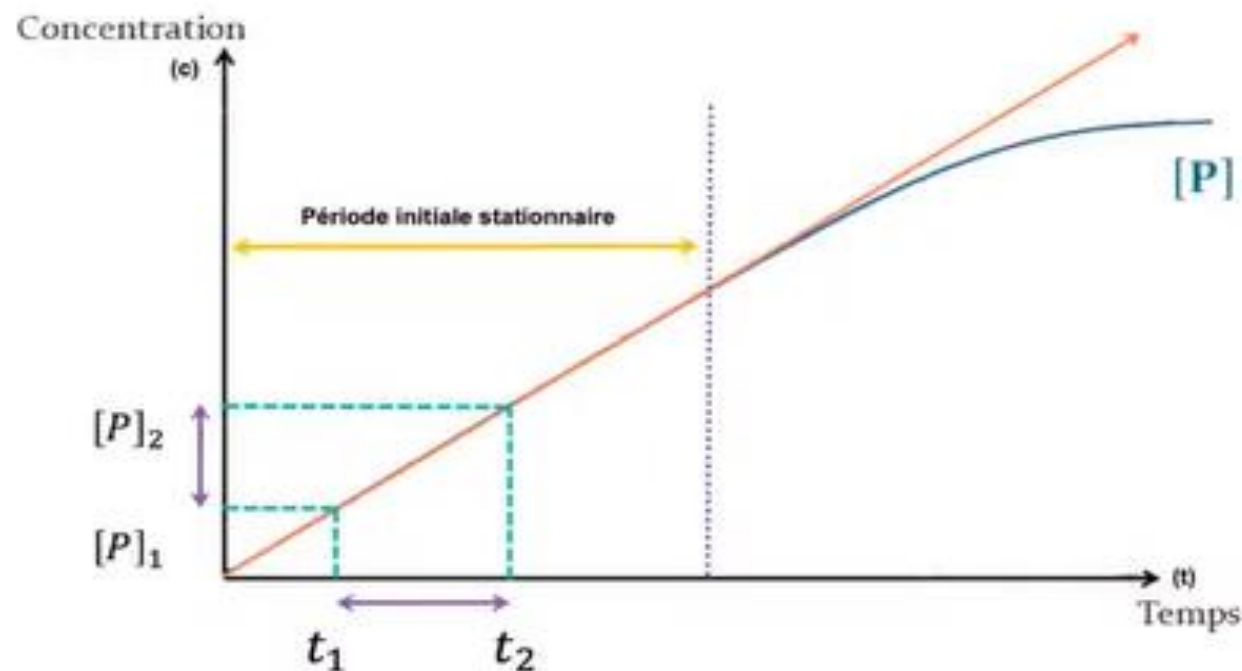
- On détermine la **vitesse initiale de réaction** ou la **vitesse de formation du produit** en mesurant la pente pendant la période stationnaire

$$v_{i(c,P)} = \frac{[P]_2 - [P]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[P]_{\text{formé}}}{\Delta t}$$

- Etant à concentration saturant en substrat :

$$v_{imax(c,P)} = \frac{[P]_2 - [P]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[P]_{\text{formé}}}{\Delta t}$$

## La méthode cinétique



- Ainsi

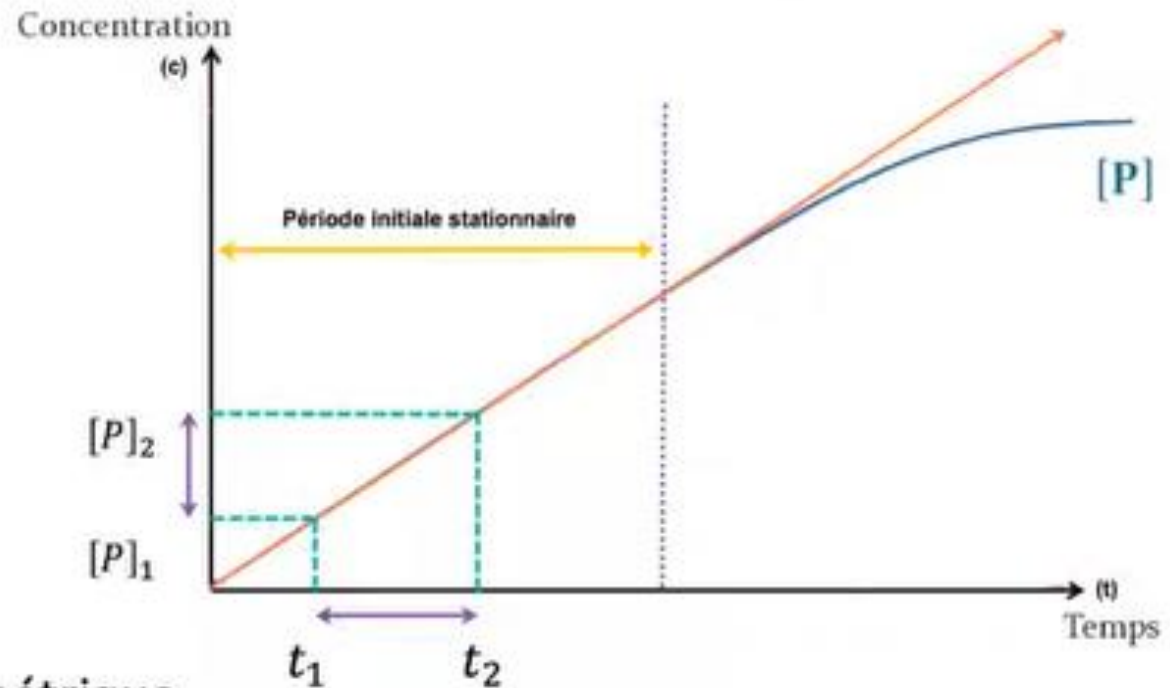
- On détermine la **vitesse initiale de réaction** ou la **vitesse de formation du produit** en mesurant la pente pendant la période stationnaire

$$v_{i(c,P)} = \frac{[P]_2 - [P]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[P]_{\text{formé}}}{\Delta t}$$

- Etant à concentration saturant en substrat :

$$v_{imax(c,P)} = \frac{[P]_2 - [P]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[P]_{\text{formé}}}{\Delta t}$$

## La méthode Cinétique



- En pratique
  - On réalise une étude spectrophotométrique

$$v_{i\max}(A,P) = \frac{[A]_2 - [A]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

- En appliquant de la même façon la loi de Beer Lambert on obtient :

$$v_{i\max}(A,P) = \frac{1}{\varepsilon \cdot l} \cdot \frac{\Delta A_t}{\Delta t} \quad \left[ \frac{\text{mol} \cdot \text{cm}}{l} \cdot \frac{1}{\text{cm}} \cdot \frac{1}{\text{min}} \right]$$

**mol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>**

**en litre de milieu réactionnel**

## Références:

### *Sites Internet*

- 1) <https://fr.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-energy-and-transport/hs-enzymes/a/hs-enzymes-review>
- 2) <https://fr.scribd.com/document/325983399/Generalites-sur-les-enzymes>
- 3) <https://www.studocu.com/fr/document/universite-de-nantes/biochimie-2-enzymologie-et-metabolisme/chapitre-1-generalites-a-propos-des-enzymes/74867855>
- 4) <https://fr.scribd.com/document/479383565/Ch-4-5-Methodes-de-dosage-et-mesure-de-lactivite-enzymatique>