

Études expérimentales *In vitro*

1

La réaction modèle : $S \rightarrow P$

- Dans la suite du cours, nous étudierons essentiellement la réaction modèle $S \rightarrow P$ catalysée par un enzyme E.
(Cette réaction est le modèle d'une isomérisation)

- Elle peut être généralisée sous certaines réserves :



L'eau, en grand excès est à concentration constante et donc n'intervient dans la loi de vitesse



On étudie en général la vitesse à l'instant initial ou les concentrations de produits sont nulles, et donc n'influent pas sur la vitesse.



Cette réaction se ramène à $S \rightarrow P$ si S' est en excès.

Condition concernant la quantité d'enzyme

La concentration d'enzyme en mole est très inférieure à celle du substrat. 2

Étude expérimentale de l'activité d'une enzyme

Dans ce chapitre, après avoir défini quantitativement l'activité nous décrirons les principaux paramètres déterminant celle-ci dans un milieu donné.

3

Milieu de mesure

- La conformation, et donc l'activité d'une enzyme, dépend toujours du milieu d'étude qui doit être parfaitement défini.
- Une modification du milieu provoque des variations d'activité qui sont en général de quelques %, mais peut être parfois beaucoup plus élevé.
- **Remarque** : Cette influence du milieu rend en général inutile de mesurer l'activité à mieux de 10 %. C'est cette précision qui sera prise dans toute la suite du cours.

4

Paramètres devant être contrôlés dans le milieu de mesure :

- **Concentration ionique**

Dans un milieu trop peu concentré en ion, une protéine se dénature.
On se place en général à une concentration ionique de **0,1 à 0,2 mol/L**
On peut éventuellement avoir une concentration de 10^{-2} mol/L

- **pH**

Indépendamment de la dénaturation en milieu très acide ou basique, les enzymes ont une zone d'activité en général de 2 ou 3 unités autour d'un pH d'activité maximum : **il faut tamponner le milieu.**

Remarque : En général le tampon servira simultanément à fixer la force ionique

- **Stabilisants et activateurs**

Les cofacteurs liés faiblement et participant à la stabilisation de la conformation de l'enzyme ou nécessaire à son activité doivent être introduits à ne faible concentration dans le milieu

Cette concentration varie selon le cofacteur.

Elle est souvent autour de 10^{-4} mol/L mais peut être beaucoup plus faible (jusqu'à 10^{-6}) ou plus élevée

5

Quelques stabilisants ou activateurs

Les **métalloenzymes** doivent être stabilisées en introduisant dans le milieu l'**ion métallique** correspondant à concentration de 10^{-6} à 10^{-4} mol/L pour éviter la dissociation du complexe ion-apoprotéine.

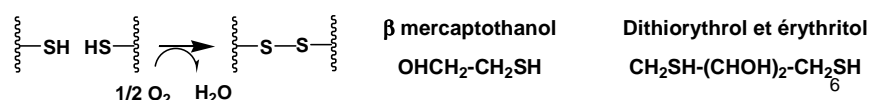
Les **kinases** et souvent les **phosphatases** doivent être activées en introduisant du **magnésium (Mg^{++})** dans le milieu.

Celui-ci complexe l'ATP, l'ADP, l'AMP et le phosphate. Ceci réduit sa charge et permet l'attaque nucléophile.

Les **enzymes ayant des thiols libres en surface** doivent être stabilisées en ajoutant du **β mercaptoéthanol (β MSH) ou du dithioérythrol ou du dithiotréitol**

Au moment de l'extraction de l'enzyme, l'oxygène de l'air oxyde l'enzyme en créant des ponts disulfures entre sous-unités, ce qui, en général provoque l'inhibition de celle-ci. L'ajout de l'un de ces 3 composés évite cette oxydation

(Ils contiennent eux-mêmes des thiols libres qui s'oxydent préférentiellement)



Mesures en continu et en discontinu

Mesure en continu :

- Dans une mesure en continu, on enregistre, pendant que la réaction se produit, un paramètre physicochimique proportionnel à la quantité ou la concentration de P (ou S) (**par exemple l'absorbance de la solution à une longueur d'onde choisie**)

Mesure en discontinu :

- Dans une mesure en discontinu, on effectue à des temps croissants des prélèvements de la solution auxquels on ajoute un agent dénaturant ou un inhibiteur de l'enzyme de façon à arrêter l'action de elle-ci. On mesure alors la quantité ou la concentration de P (ou S).
- La courbe $P = f(t)$ est alors obtenue point par point.
- Pour inhiber l'enzyme, la méthode la plus classique est d'augmenter ou diminuer fortement le pH.
- Il faut alors vérifier que au pH final la réaction non catalysée ne se produit pas. Dans ce cas on peut utiliser d'autres inhibiteurs comme l'urée ou, pour les métalloenzymes, l'EDTA

7

Définition quantitative de l'activité

- L'activité d'une enzyme dans un milieu donné est définie comme la vitesse de la réaction qu'elle catalyse exprimée en quantité de substrat par unité de temps.

NB : En chimie la vitesse de réaction est définie usuellement comme la variation de concentration par unité de temps. En enzymologie, c'est la variation de quantité par unité de temps qui est utilisée.

Remarque : on pourra, si on le désire utiliser l'activité/mL.

- Toute unité de vitesse peut être a priori utilisée. Par exemple la mole par minute.
- Cependant, l'union internationale de biochimie a défini deux unités que l'on utilise en général : **L'unité internationale (Unité U) et le nanokatal (nkat).**

8

Définition quantitative de l'activité (suite)

L'unité internationale (U)

- L'unité d'activité U est la quantité d'enzyme qui transforme une micromole par min ($1 \mu\text{mol}/\text{min}$) dans les conditions de l'essai.
- NB : Si la quantité de substrat n'est pas indiquée, celui-ci est supposé en excès (vitesse maximum voir plus loin)

Le katal (kat)

- Le katal est la quantité d'enzyme qui transforme une mole par sec ($1 \text{ mol}/\text{s}$) dans les conditions de l'essai.
- On utilise préférentiellement le nanokatal (nkat) soit $1 \text{ nanomol}/\text{s}$
- Additivité :
- L'activité est une grandeur additive : si on mélange une préparation contenant n_1 unités et une autre en contenant n_2 la préparation obtenue en contiendra n_1+n_2 .

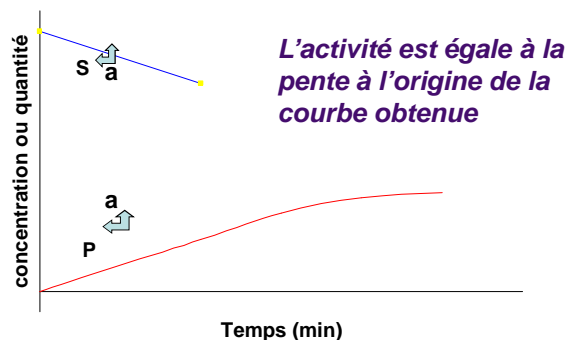
NB : L'activité est donc une mesure à la fois de la vitesse de réaction et de la quantité d'enzyme présente.

9

Mesure de l'activité : principe

Pour mesurer l'activité, on introduit dans le milieu de mesure : l'enzyme E à concentration fixée et du substrat S .

On mesure en fonction du temps un paramètre proportionnel à la concentration ou la quantité de produit formé ou de substrat disparu.

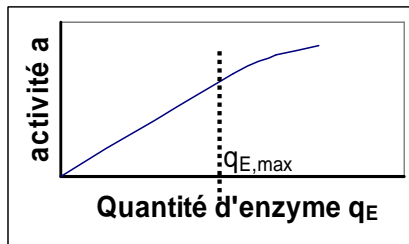


NB : On peut aussi ajouter du produit et mesurer de même l'activité en présence de produit

10

Influence de la quantité d'enzyme

- **Rappel** : La concentration d'enzyme introduite est toujours très inférieure à celle de substrat.
- La réaction est étudiée dans un milieu fixé pour une concentration de substrat **S** fixée. Une première étude est en général menée pour des concentrations de substrat en excès.



L'activité est proportionnelle à la quantité d'enzyme pour une quantité introduite de celle-ci inférieure à $q_{E,max}$:

$$q_e < q_{E,max} \quad a = k q_E$$

Si \underline{S} est en excès

$$a = k_{cat} q_E$$

- **Interprétation** : Les molécules d'enzymes portent de multiples charges positives et négatives. A trop forte concentration, les molécules ont tendance à s'associer. Tout se passe comme s'il y avait moins d'enzyme
- **Conditions expérimentales** : Pour une étude de l'enzyme *in vitro*, on introduit toujours une quantité d'enzyme inférieure à $q_{E,max}$.
- Ceci n'est pas toujours vrai *in vivo*.

11

Détermination de la quantité d'enzyme

- On fixe un temps d'expérience pour la mesure d'une activité (on trace la courbe $[P]=f(t)$ ou $q_P=f(t)$)
- On choisit la quantité d'enzyme pour que la courbe obtenue soit exploitable (les quantités de P formées ne devront être ni trop faibles ni trop fortes)

Cas de la colorimétrie

- Le plus souvent, la variation de DO choisie sera d'environ **0,1 DO/min** si E travaille à saturation.

• On sait que $dDO/dt = \epsilon lc$. L'activité introduite dans la cuve devra donc être :

$$a = \frac{0,1 v_{cuve}}{\epsilon l} \text{ mmol/min} = \frac{1000 * 0,1 v_{cuve}}{\epsilon l} \text{ U} (\mu\text{mol/min})$$

En général

$$a = \frac{1000 * 0,1 * 3}{\epsilon} \text{ U} \\ \text{(cuve de 3 mL)}$$

12

Protocole de mesure de l'activité

- Les mesures se feront dans un milieu fixé (conc. Ionique, pH, modulateurs)

(Pratiquement, vous préparerez un volume important de ce milieu qui sera utilisé pour réaliser les solutions mères et les dilutions nécessaires)

- Remarque :

La mesure de l'activité s'effectue toujours en traçant l'une des courbes

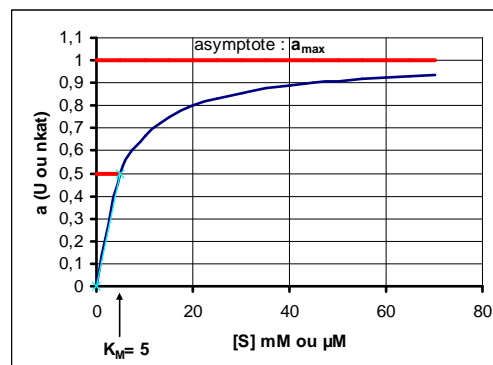
$$-a = f([P]) \quad a = f(q_P) \quad a = f([S]) \quad a = f(q_S)$$

- Les courbes donnant l'activité en fonction de la quantité d'enzyme ou de substrat sont donc toujours obtenues en discontinu

13

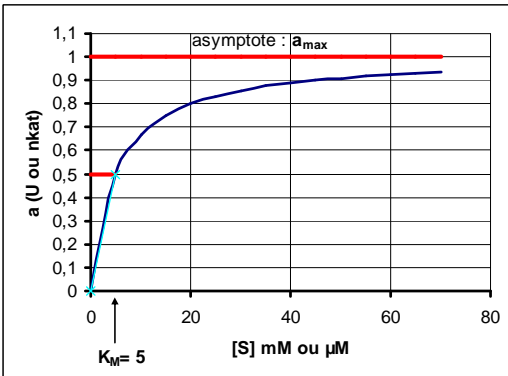
Influence de la quantité de substrat Cas des enzymes michaliennes

- Les enzymes dont le mécanisme est le plus simple sont dites michaliennes, les autres allostériques.
- 80 % environ des enzymes sont michaéliennes, mais les autres jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme
- On mesure l'activité en fonction de la concentration de S dans un milieu fixé.



14

Influence de la quantité de substrat Cas des enzymes michaliennes



La courbe obtenue est caractérisée par

- Une activité max :

$$a_{\max} = k_{\text{cat}} q_E$$

- Une concentration de S telle que

$$a = a_{\max} / 2 \quad \text{soit} \quad K_M$$

On appelle constante de Michaelis (K_M), la concentration de substrat pour laquelle l'activité est égale à la moitié de l'activité maximum.

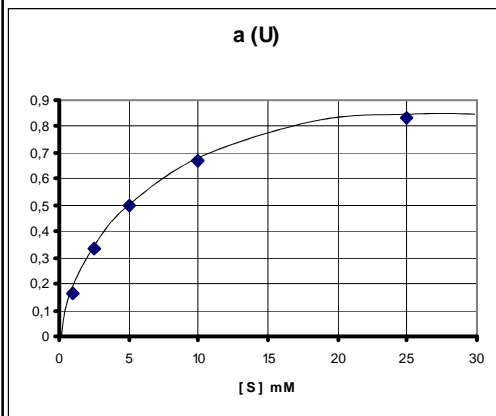
Équation de la courbe

$$a = \frac{a_{\max} [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{\text{cat}} q_E [S]}{K_M + [S]}$$

15

Détermination de la quantité de substrat

- Si on désire déterminer a_{\max} ,
 - on fixe la concentration de S à $10 K_M$
 (précision de 10 % en général suffisante)
- Pour tracer la courbe $a=f[S]$ et déterminer a_{\max} et K_M



On choisit 5 concentrations de S encadrant K_M

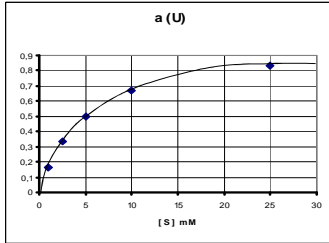
Ces concentrations seront choisies entre $0,2$ et $5 K_M$

Par exemple :

$0,2 K_M$ $0,5 K_M$ K_M $2 K_M$ $5 K_M$

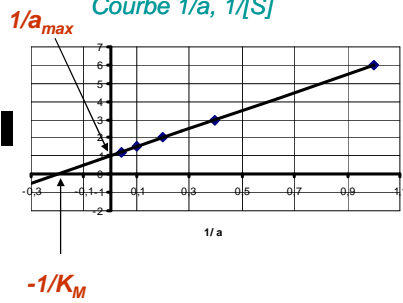
16

Analyse des résultats

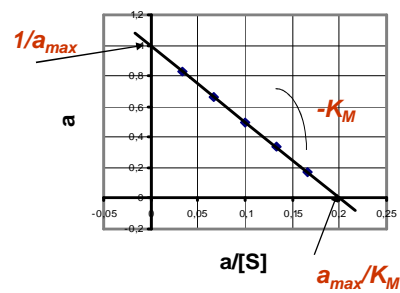


- La courbe $a=f[S]$ ne permet d'obtenir a_{max} que par extrapolation, donc avec une forte imprécision.
- Il en résulte que K_M est également mesurée avec peu de précision
- Pour déterminer ces deux grandeurs, on procède par linéarisation

Linéarisation de Lineweaver Burks
Courbe $1/a, 1/[S]$



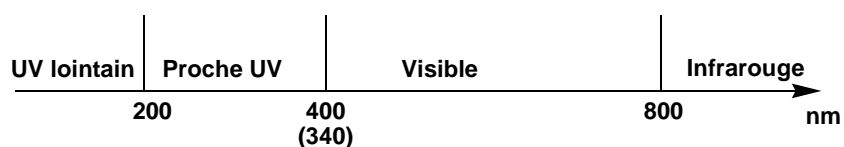
Linéarisation de
Courbe $a, A/[S]$



Techniques de détection

Colorimétrie

- La lumière visible a une longueur d'onde comprise entre 400 et 800 nm. La lumière ultraviolette proche correspond aux longueurs d'ondes allant de 200 à 400 nm.
- (A une longueur d'onde inférieure à 200 nm, l'eau absorbe la lumière ; donc devient opaque – C'est l'UV lointain)



- Les composés organiques portant un cycle aromatique, tels que le benzène absorbent dans le visible ou le proche ultraviolet avec un maximum à une longueur d'onde déterminée.

19

Colorimétrie (suite)

- La colorimétrie consiste à envoyer une lumière monochromatique d'intensité I_0 travers une cuve d'épaisseur déterminée.
- On mesure l'intensité de la lumière sortante I .

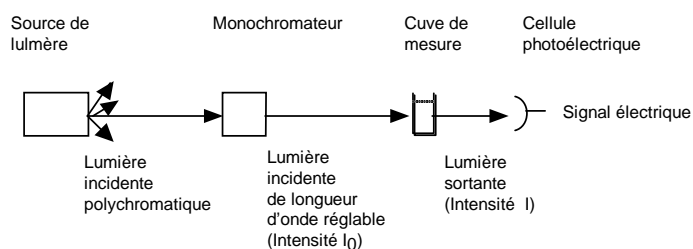
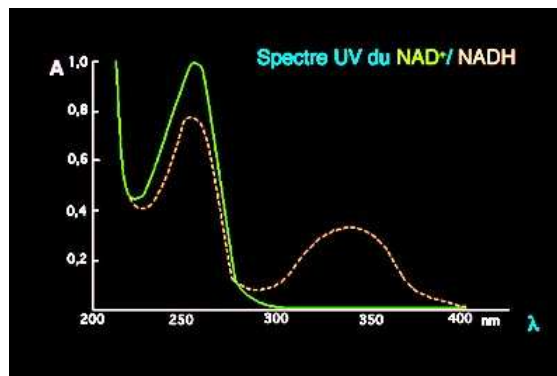


Schéma d'un colorimètre

- A la longueur d'onde d'absorption maximum d'un composé ou à une longueur d'onde voisine, l'absorbance ou densité optique est égale à $\log I_0/I$.
- Elle est proportionnelle à la concentration du composé **$DO = \epsilon lc$**
- (l est l'épaisseur de la cuve, en général 1 cm et ϵ le coefficient d'extinction moléculaire, fonction de la longueur d'onde et de la nature du composé ²⁰)

Colorimétrie (*suite*) : substrats importants NADH

- Contrairement au NAD⁺, le NADH absorbe la lumière à 340 nm
 $\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- L'absorbance du NADH permet de mesurer l'activité de toutes les deshydrogénases NAD dépendantes.
- NB : Le NADH a un pic d'absorbance très intense à 260 nm
- Cette bande est commune avec le NAD⁺ et ne peut être utilisée



21

Colorimétrie : Cas des substrats n'absorbant pas la lumière

- De nombreuses enzymes catalysent des réactions pour lesquels aucun substrat n'absorbe la lumière.
- Deux méthodes permettent de mesurer l'activité par colorimétrie :
 - 1) Ajout d'un colorant chimique
 - 1) Couplage d'enzymes

Colorant chimique

- On ajoute à la préparation un chromophore réagissant avec le substrat ou le produit pour former un complexe coloré

EXEMPLE : Enzymes catalysant la libération d'ammonium (uréase...)

Le réactif de Nessler se fixe en milieu basique sur l'ammonium en donnant un complexe absorbant fortement la lumière.

Pratiquement toujours, l'ajout du colorant inhibe l'enzyme.

La méthode du colorant chimique est une méthode en discontinu

22

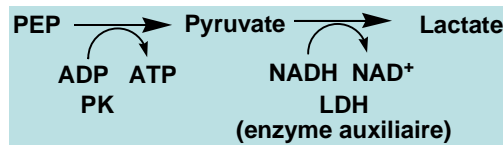
Colorimétrie : Cas des substrats n'absorbant pas la lumière (suite)

Couplage d'enzyme ou enzyme auxiliaire

- On ajoute à la préparation une deshydrogénase NAD dépendante oxydant ou réduisant le produit. (Elle est dite **enzyme auxiliaire**)
- On mesure par colorimétrie la vitesse d'apparition ou disparition du NADH

EXEMPLE : Mesure de l'activité de la pyruvate kinase (PK)

On ajoute de la lactate déshydrogénase (LDH) :



- La vitesse de l'ensemble doit être déterminé par l'activité de l'enzyme étudiée (PK)
- La quantité d'**enzyme auxiliaire** ajoutée doit être telle que si elle travaillait à saturation, son **activité** serait **au moins 20 fois celle de l'enzyme étudiée**.
- L'enzyme auxiliaire travaille alors hors saturation en consommant le substrat dès qu'il se forme

23

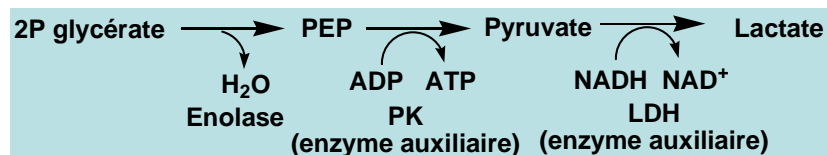
Colorimétrie : Cas des substrats n'absorbant pas la lumière (suite)

Couplage d'enzyme (suite)

- **S'il n'existe pas de deshydrogénase réagissant avec le produit, on peut introduire plusieurs enzymes auxiliaires**

EXEMPLE : Mesure de l'activité de l'énolase

On ajoute de la pyruvate kinase et de la lactate déshydrogénase :

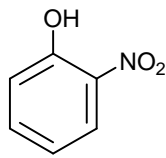


- Les activités à saturation des enzymes auxiliaires doivent être égales à au **moins 20 fois** celle de l'enzyme étudiée. Il n'y a pas de condition imposée entre les activités des enzymes auxiliaires

24

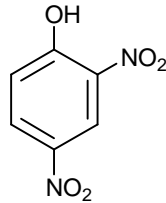
Colorimétrie (*suite*) : substrats importants

Orthonitrophénol (ONP) et paranitrophénol (PNP):



ONP

$\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$
 $\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$



PNP

$\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$
 $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

NB : en fait, c'est la forme basique qui absorbe (ΦO^-)
Il faut faire les mesures à pH supérieur à 7

- Ces composés n'existent pas *in vivo*
- On les utilise sous forme de condensats pour étudier de nombreuses hydrolases
- Exemple : phosphatases : paranitrophénolphosphate (PNPP) 25

Autres techniques de mesures de l'activité

- La méthode la plus courante pour mesurer une activité enzymatique est la colorimétrie.
- Pratiquement, il existe une méthode colorimétrique publiée pour toutes les enzymes connues.

De nombreuses autres techniques, dépendant du type d'enzymes, peuvent être utilisées

• En particulier :

- La fluorimétrie
- La voltampérométrie
- La technique du pH stat
- La polarimétrie (mesure de la rotation du plan de polarisation de la lumière par les molécules chirales)
- Le marquage radioactif....

26

Technique du pH stat

- Cette méthode permet de mesurer l'activité si la réaction produit ou fixe des H^+
- Elle est essentiellement utilisée pour des hydrolases, les réactions correspondantes libérant en général des H^+

Exemple : $RCOOR' \rightleftharpoons RCOO^- + ROH + H^+$

- La mesure s'effectue dans un milieu non tamponné (**maintenu à force ionique suffisante par ajout de NaCl**). Le pH est maintenu constant en neutralisant les H^+ par de la soude ou de la potasse.
- On mesure en fonction du temps le nombre de moles de soude versées.
- Celui-ci est égal au nombre de moles de substrat consommées. La pente de la courbe donne l'activité

