

Lysozyme et son substrat

**Des catalyseurs biologiques extraordinaires!**

## Avertissements :

1- le présent document est exclusivement destiné aux élèves de terminale S du lycée J H Fabre et a donc un but pédagogique et une diffusion restreinte

2- certains éléments peuvent ne pas être libres de droits, l'auteur n'est pas responsable de l'usage qui peut en être fait

3- [...  
P. Mueller et D. Oppenheimer ont évalué les deux groupes de participants une semaine après le cours. Là encore, ceux qui avaient pris des notes à la main ont obtenu les meilleures performances. Ces notes, qui incluent les propres mots et l'écriture des étudiants, semblent rappeler plus efficacement les souvenirs, en recréant aussi bien le contexte (les processus de pensée, les émotions, les conclusions) que le contenu (notamment les données factuelles) de la session d'apprentissage.

Ces résultats ont des implications importantes pour les étudiants qui se fondent sur du contenu mis en ligne par les enseignants. Quand ils ne prennent aucune note, ils n'organisent pas les informations et ne les synthétisent pas dans leurs propres mots. Ainsi, ils ne s'engagent pas dans le travail mental qui favorise l'apprentissage.

...]

Pam Mueller, de l'Université de Princeton, et Daniel Oppenheimer, de l'Université de Californie à Los Angeles, 2014

4- Un cours de TS ça se mérite! (anonymes 2012)

## T3-a- Introduction – Aliments et nutriments sources d'ATP

Énergie nécessaire apportée par les aliments ( <i>Observation</i> )	Rendement de la conversion Énergie → ATP + chaleur Alim. ( <i>Mesure</i> )	Masse molaire de l'ATP ( <i>Calculs et mesures</i> )	Réserve dans l'organisme ( <i>Estimation</i> )	Énergie chimique potentielle de l'ATP ( <i>mesures</i> )	
				Conditions standard	Conditions physiologiques
10 000 KJ.j <sup>-1</sup>	0,5 ATP + 0,5 Chaleur	507,181 g.Mol <sup>-1</sup>	0,1 Mol 50 g	30,5 KJ.Mol <sup>-1</sup>	50 KJ.Mol <sup>-1</sup>

Valeurs énergétiques et caractéristiques de l'ATP

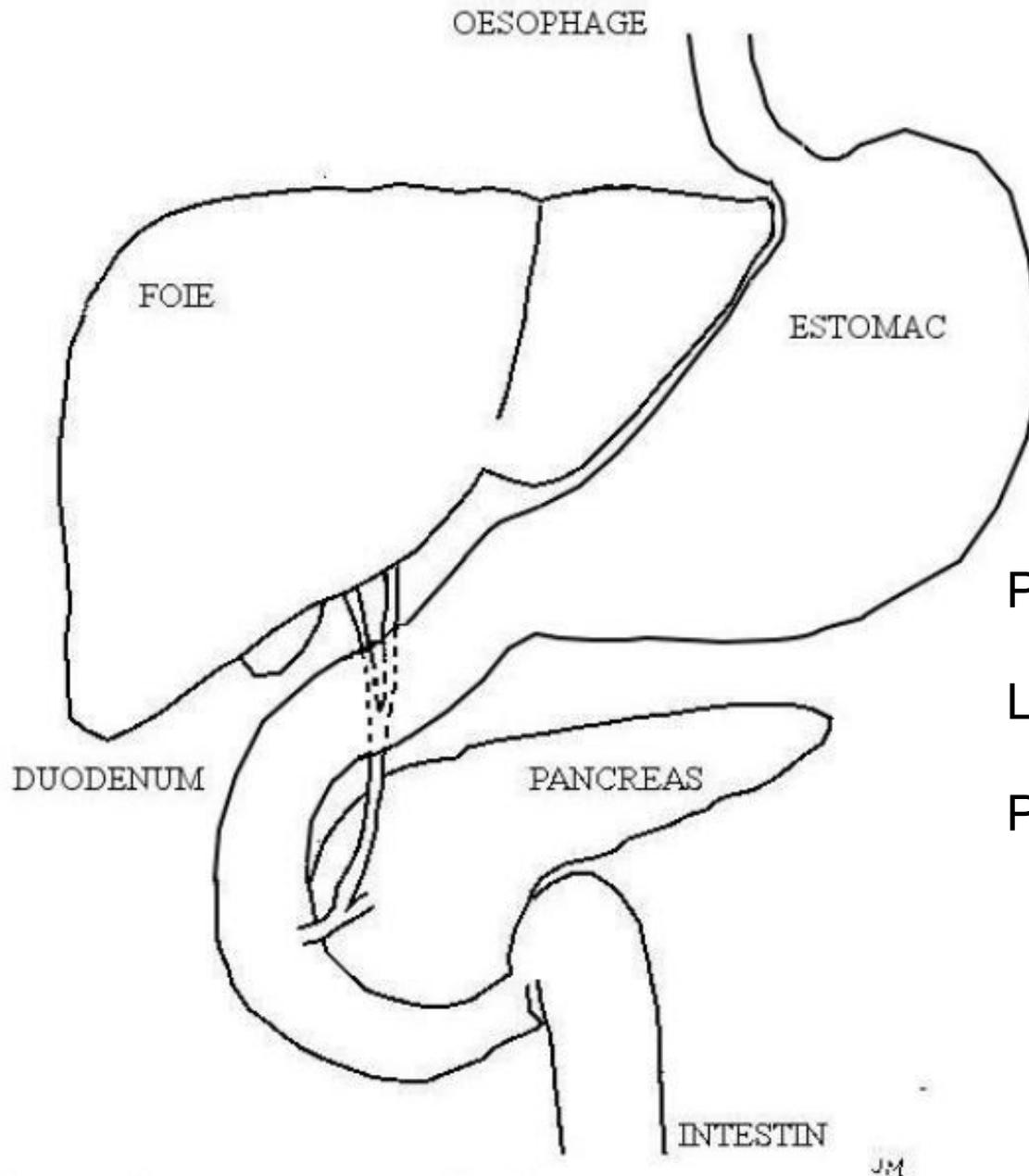
**Mq: le fonctionnement de l'organisme nécessite l'hydrolyse de 45 à 50 Kg d'ATP par jour.**

Classe de molécules organiques	Énergie chimique potentielle (KJ.g <sup>-1</sup> )
Protides	17
Lipides	37
Glucides	17

Valeurs énergétiques des différentes molécules organiques (conditions physiologiques).

**Les aliments consommés lors des repas apportent l'énergie nécessaire au renouvellement très rapide de l'ATP.**

## T3-a- Introduction – Aliments et nutriments sources d'énergie



**La digestion transforme les aliments en nutriments;**

- molécules plus simples
- souvent solubles
- pouvant être transportées par le sang (ou la lymphe)

Protéines → acides aminés

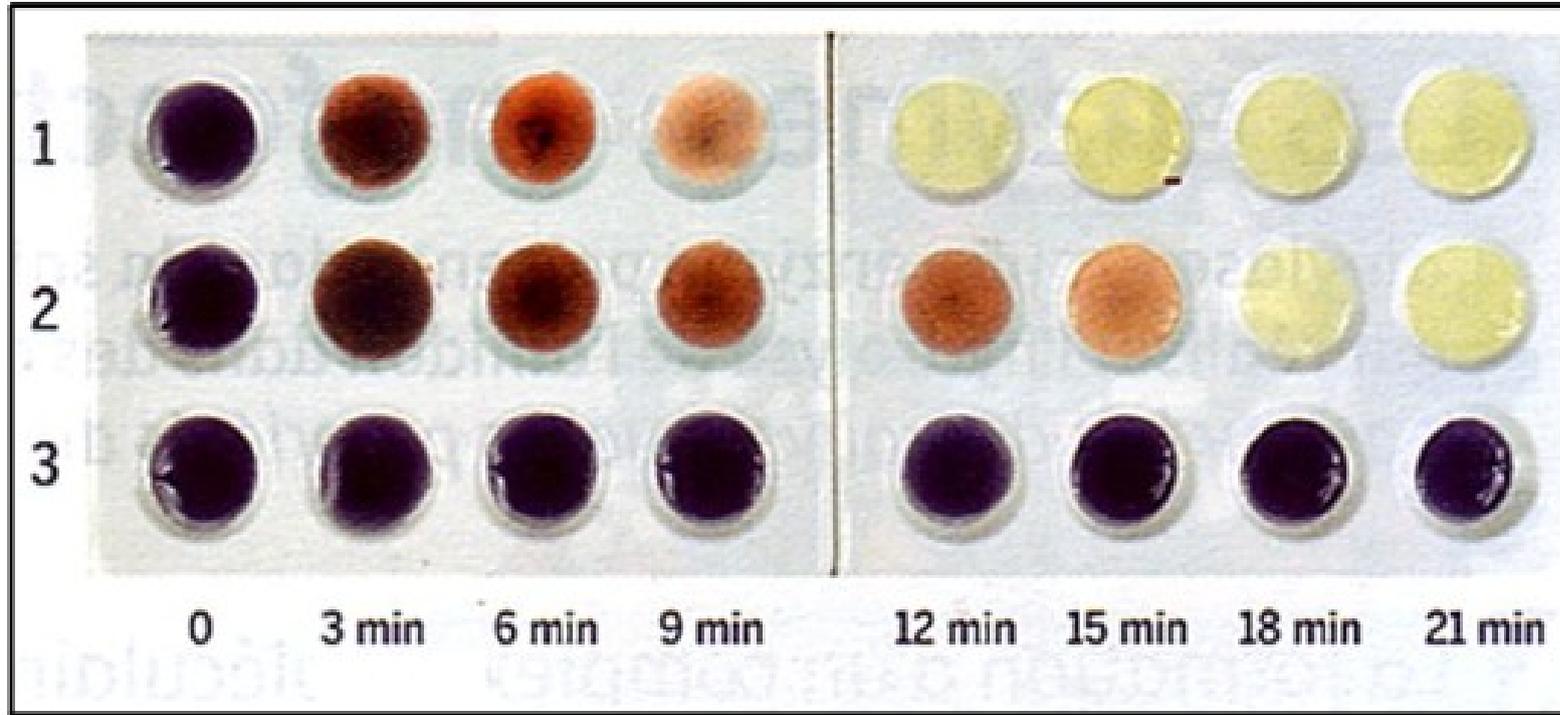
Lipides → acides gras + glycérol

Polymères glucidiques → sucres simples

**La digestion est;**

- rapide (minutes, heures)
- thermiquement compatible avec le vivant (37°C)

## T3-a-1 Enzymes ~ caractéristiques de la réaction enzymatique



### Contenu des tubes :

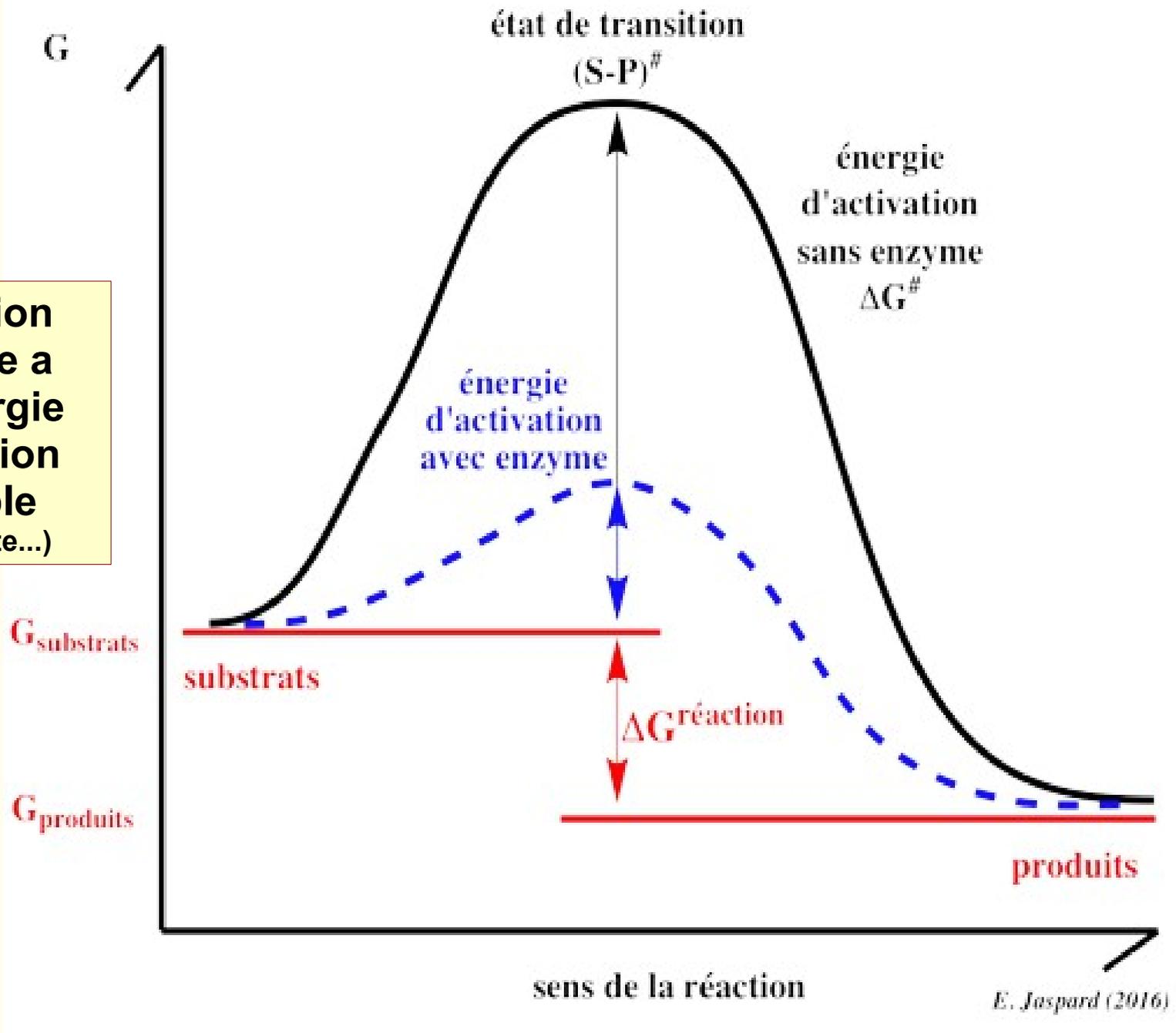
1. 10 ml. d'empois d'amidon + 3 ml HCl, T = 100 °C.
2. 10 ml. d'empois d'amidon + 3 ml d'amylase, T = 35 °C.
3. 10 ml d'empois d'amidon + 3 ml d'eau, T = 35 °C.

*D'après Bordas 2012*

**La réaction catalysée est presque aussi rapide, parfois plus rapide que la réaction minérale et elle se déroule dans des conditions compatibles avec le vivant.**

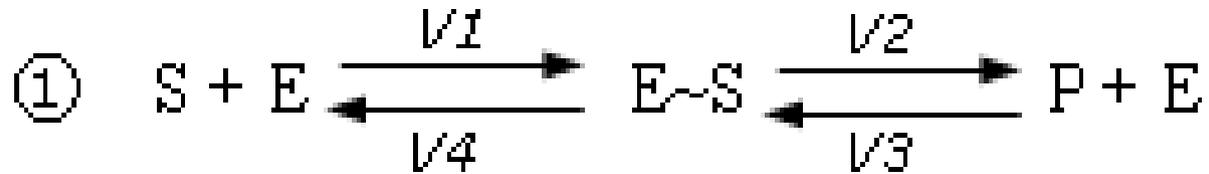
## T3-a-1 Enzymes ~ caractéristiques de la réaction enzymatique

La réaction catalysée a une énergie d'activation plus faible (basse, petite...)

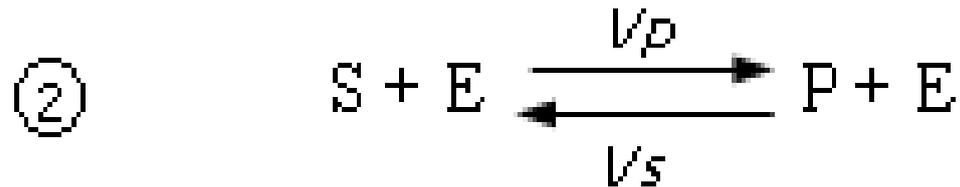


La variation d'enthalpie libre reste la même!

## T3-a-1 Enzymes ~ modélisation, des équilibres dynamiques ...



S = substrat, E = enzyme, P = produit  
*V1, V2, V3, V4 sont les vitesses des réactions.*



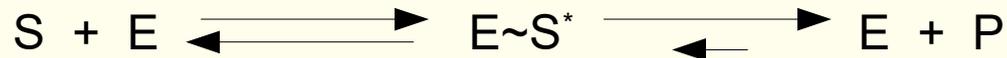
$$Vp = (V1 \text{ ou } V2) \quad Vs = (V3 \text{ ou } V4)$$

$$\textcircled{3} \quad Va = Vp - Vs$$

Pratiquement les vitesses  $V1$  et  $V2$  sont du même ordre de grandeur  
 De même pour les vitesses  $V1$  et  $V4$ . De plus  $V3$  est souvent très faible.  
 On peut donc adopter une formulation simplifiée (2).

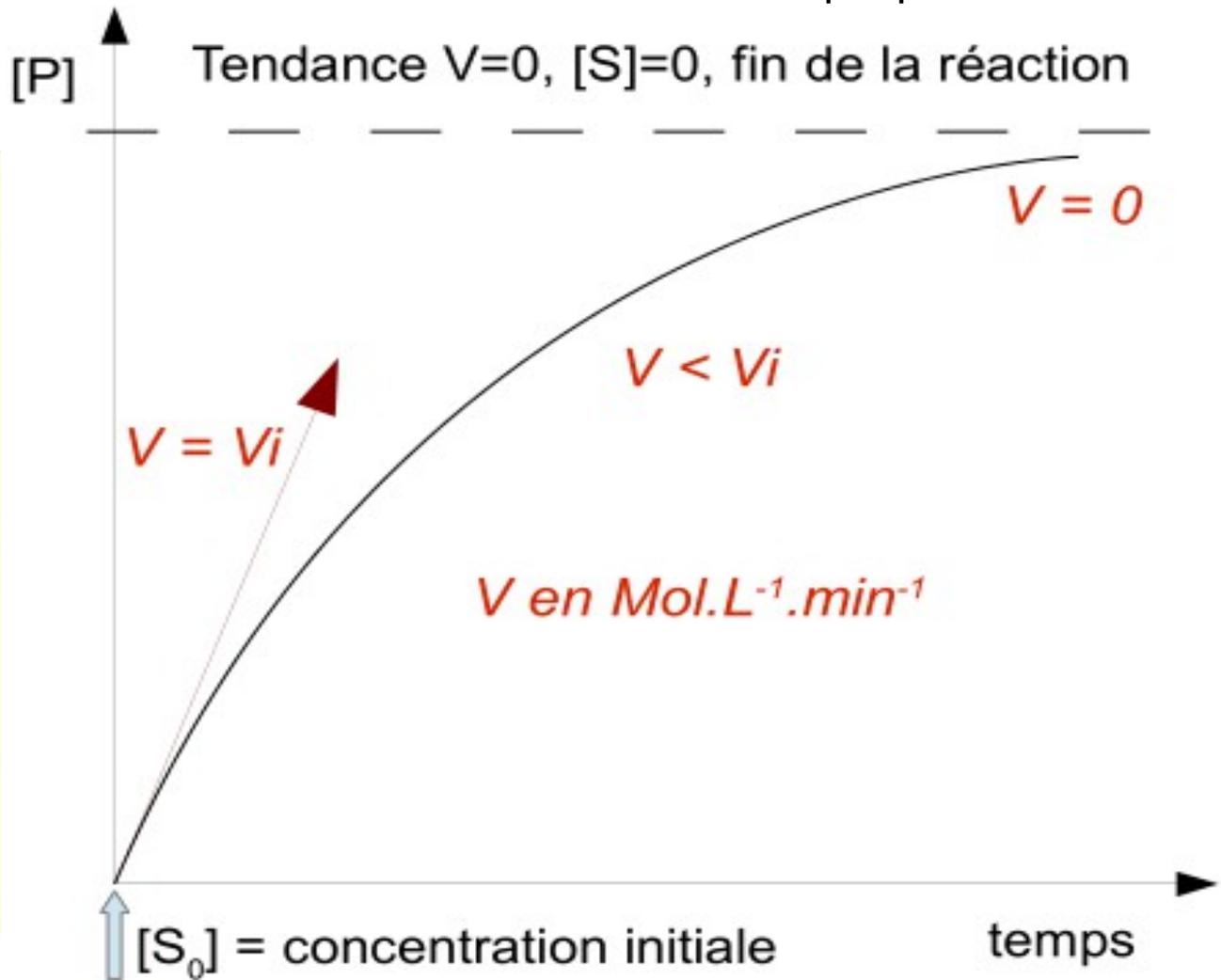
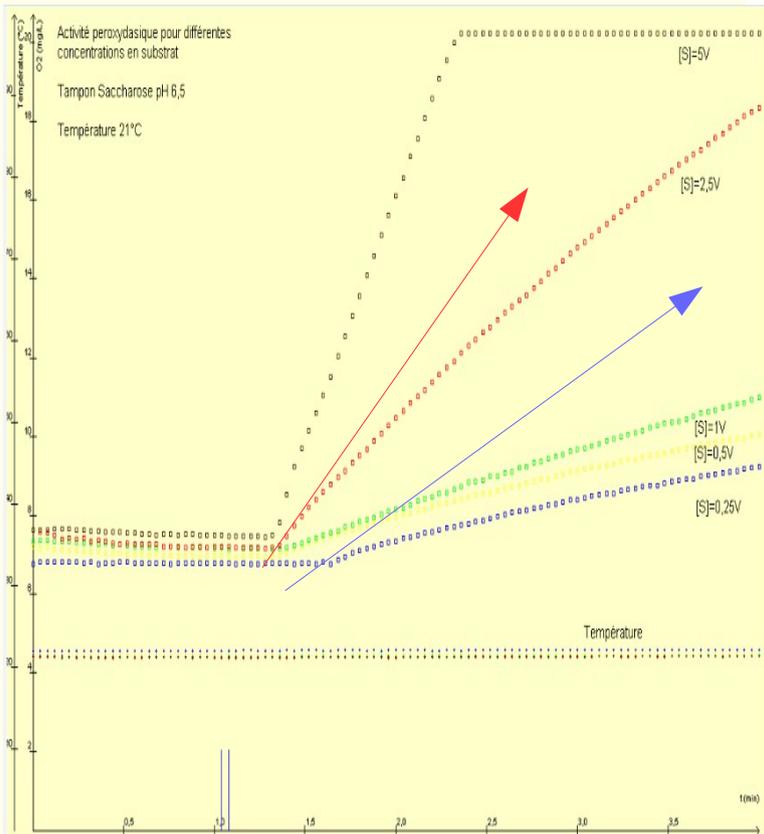
**La vitesse d'avancement de la réaction  $Va$  (3) est celle qui est effectivement observable (vitesse apparente) .**

## T3-a-1 Enzymes ~ modélisation l'équation qui va au bac.!



$V = d[P] / dt$  ou bien  $V = - d[S] / dt$  en  $Mol.L^{-1}.S^{-1}$  ou concentration massique par Seconde

Vu en TP

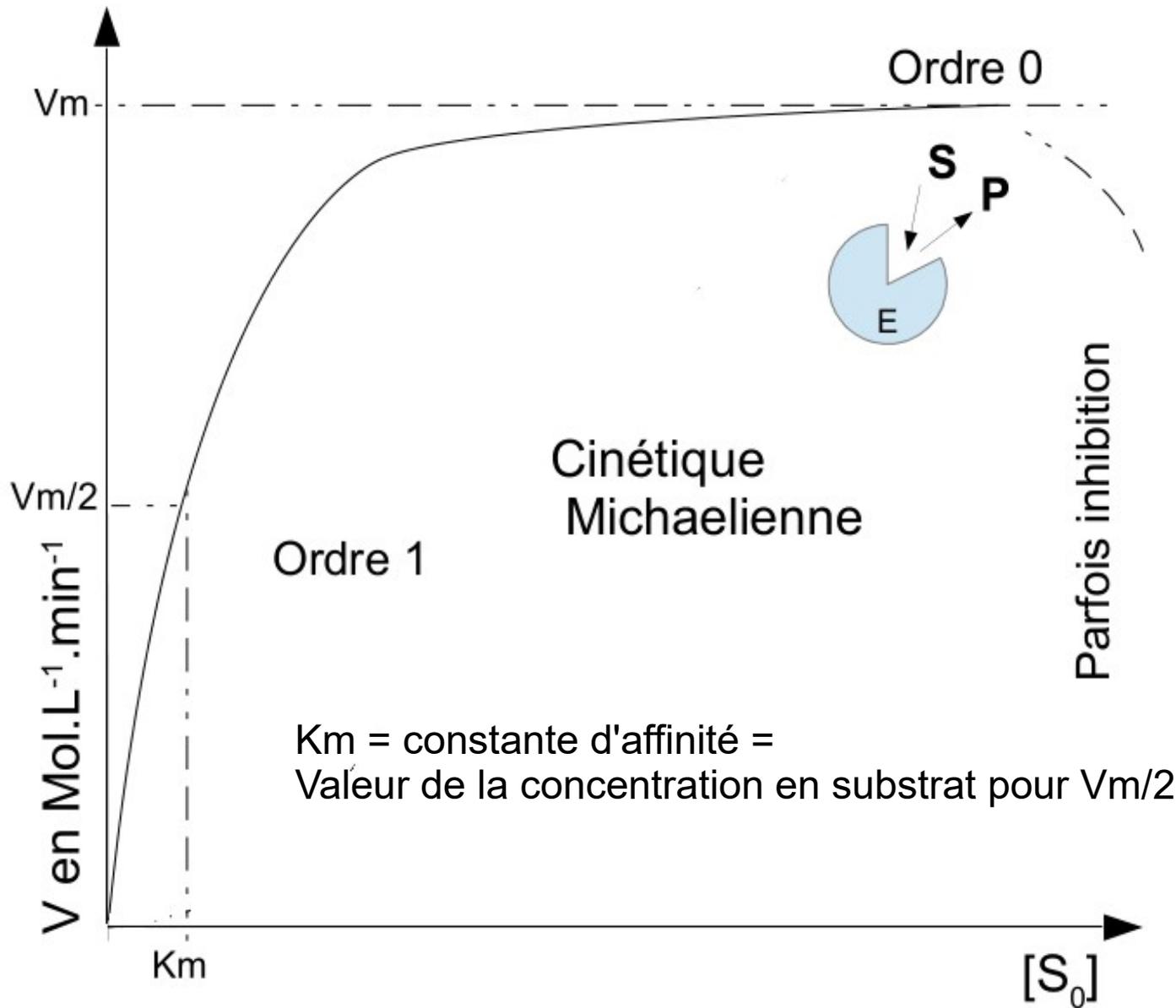


$V_{imax}$

Le meilleur paramètre de suivi de la réaction est  $V_i$  car dès que E est active  $[S]$  diminue et  $V$  aussi

## T3-a-1 Enzymes ~ modélisation; le modèle de Michaelis-Menten

Ici  
 $V = V_{\text{imax}}$



**La saturation par le substrat suggère l'existence d'un nombre fini de sites réactionnels disponibles à un instant t.**

T3-a-1 Enzymes ~ modélisation; le modèle de Michaelis-Menten 1913



V. Henri (Fr)

$$(1) v_{\text{imax}} = \frac{V_m \times [S_0]}{K_m + [S_0]}$$



L. Michaelis (D)



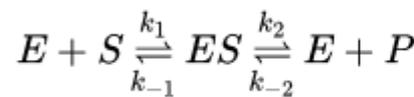
M. Menten (Ca)

$v_{\text{imax}}$  = vitesse initiale maximale pour la concentration  $[S_0]$  testée,  $V_m$  = vitesse initiale maximale lorsque le substrat est saturant,  $[S_0]$  = concentration initiale en substrat testée,  $K_m$  = Constante d'affinité; valeur de la concentration en substrat permettant d'obtenir  $V_m/2$

Début du XXIème siècle; pour une réaction élémentaire, l'ordre est égal à la molécularité (loi de van 't Hoff). Ex:  $A + B \rightarrow C$  et la vitesse  $v = -d[A]/dt = k \times [A] \times [B]$ , ordre 1 par rapport à B, la vitesse augmente linéairement avec la concentration d'un réactif, B par exemple.

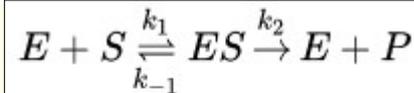
La loi de van t'Hoff ne décrit pas bien le comportement des enzymes cf courbe  $V = f([S_0])$

Les auteurs proposent **cet équilibre** et



avec  $k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}$  les constantes de vitesse des différentes étapes.

**2 hypothèses simplificatrices**



$$v = k_2 \times [ES]$$

a- pas de réaction inverse

b- état stationnaire du complexe E~S

d'où  $d[ES]/dt = 0 \Leftrightarrow ES \rightarrow E+P$  est limitante

Démonstration de (1) ici

<https://planet-vie.ens.fr/article/2129/cinetique-enzymes-michaeliennes-equation-michaelis-menten>

T3-a-1 Enzymes ~ modélisation; Linéarisation de Lineweaver-Burk 1934

$$(1) V_{imax} = \frac{V_m \times [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

$V_{imax}$  = vitesse initiale maximale pour la concentration  $[S_0]$  testée  
 $V_m$  = vitesse initiale maximale lorsque le substrat est saturant  
 $[S_0]$  = concentration initiale en substrat testée  
 $K_m$  = Constante d'affinité; valeur de la concentration en substrat permettant d'obtenir  $V_m/2$

→ Le modèle de Michaelis-Menten-Henri décrit bien la réalité => on accepte les 2 hypothèses  
 → Il permet de définir  **$K_m$ , la constante d'affinité**; une caractéristique de l'enzyme qu'il faut pouvoir mesurer expérimentalement.

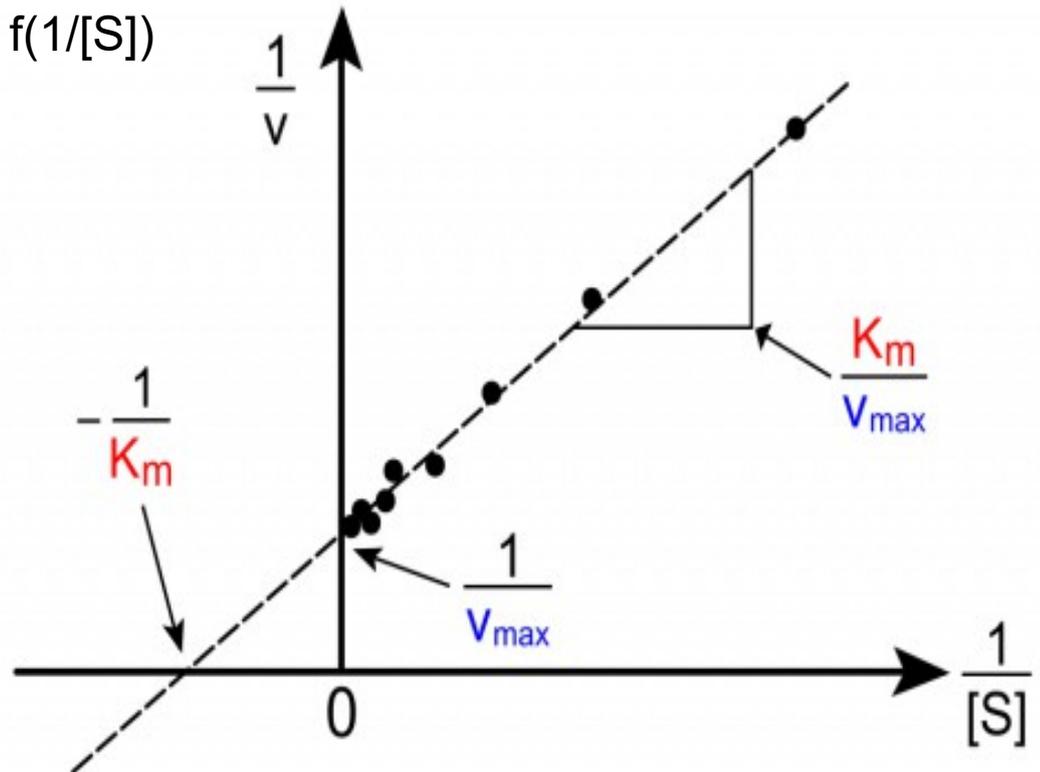
Lineweaver-Burk proposent d'étudier  $1/V_{imax} = f(1/[S])$

On peut montrer que:

$$\frac{1}{V_{imax}} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Qui est de la forme  $Y = A \cdot X + B$

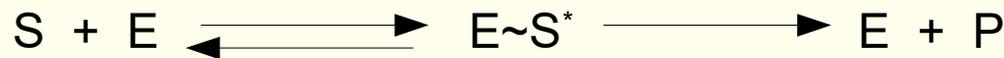
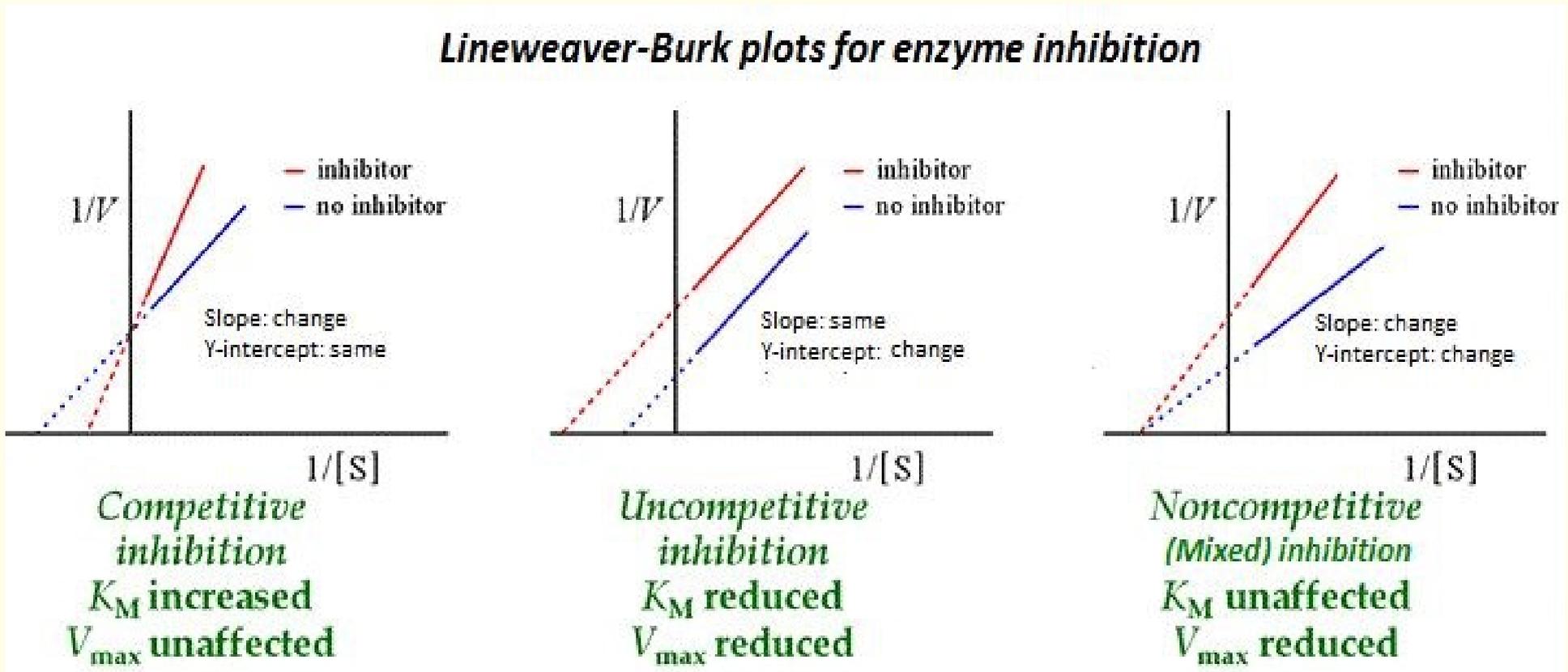
L'extrapolation  $1/V_{imax} = 0$ , qui n'a pas de sens en biologie permet de trouver par résolution simple la valeur  $-1/K_m$



La méthode est sensible aux incertitudes mais elle est simple à comprendre et facile à réaliser.

**T3-a-1 Enzymes ~ modélisation; Exemple pratique et utilisation**

Rappel:  $f(K_m) = V_m/2$ , si  $K_m \uparrow$  alors affinité  $\downarrow$



+ Belin spéSVT 2012 Ex 10 p 167

## T3-a-1 Enzymes ~ Diversité des enzymes

Enzyme commission ~**3200 enzymes** référencées, 6 classes

EC 1 **Oxydo-réductases** : catalysent les réactions d'oxydo-réduction comme les oxygénases

EC 2 **Transférases** : transfèrent un groupement fonctionnel (par ex. un groupe phosphate)

EC 3 **Hydrolases** : catalysent l'hydrolyse de diverses liaisons

EC 4 **Lyases** : brisent diverses liaisons par d'autres procédés que l'hydrolyse et l'oxydation

EC 5 **Isomérases** : catalysent les réactions d'isomérisation d'une molécule

EC 6 **Ligases** : joignent deux molécules par des liaisons covalentes

Exemple : EC 2.7.3.2 est la **créatine-kinase**

2 = classe des transférases

7 = sous-classe des phosphotransférases

3 = sous-sous-classe des phosphotransférases qui ont un accepteur avec de l'azote

2 = numéro d'ordre de l'enzyme en question.

Mais EC 3.6.3.14 est l'**ATP synthase transmembranaire**. Une hydrolase et non une transférase car son rôle est (souvent) réversible comme pompe à proton avec consommation d'ATP ou comme génératrice d'ATP utilisant un gradient de protons.

**Comment comprendre cette diversité?**

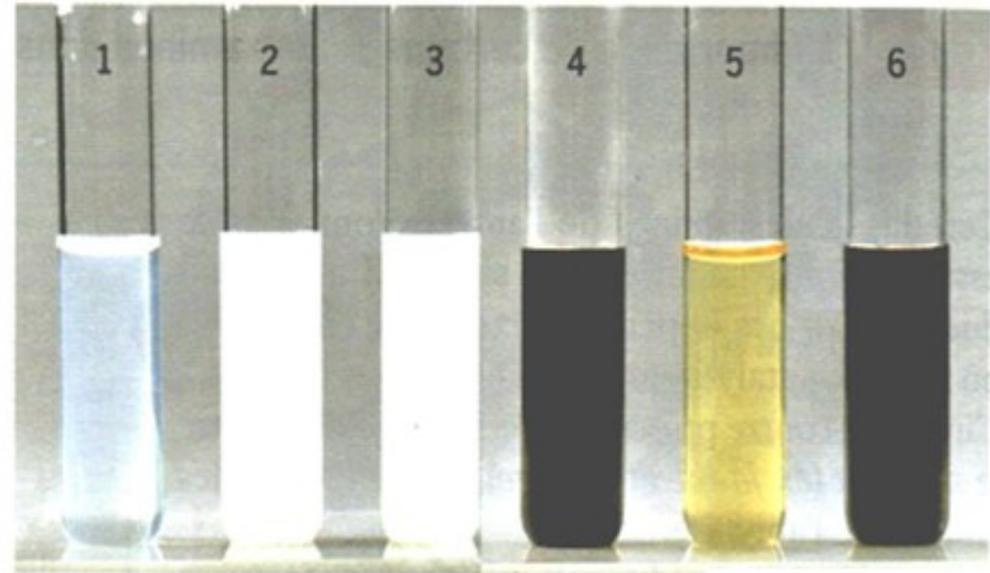
## T3-a-2 La double spécificité enzymatique ~ la spécificité de substrat

## La spécificité de substrat

On dispose des produits suivants : précipité d'ovalbumine (protéine de blanc d'œuf), empois d'amidon, amylose, pepsine, acide dilué.

- Préparer six tubes en réalisant les mélanges indiqués dans le *tableau ci-contre* (4 mL de substrat + 20 gouttes de solution enzymatique ou d'eau).
- Placer les tubes au bain-marie à 35 °C pendant 20 minutes environ.
- À la fin de l'expérience, ajouter une goutte d'eau iodée aux tubes 4, 5 et 6.

**Remarque :** la pepsine n'agissant qu'en milieu acide, ajouter quelques gouttes d'acide dilué aux tubes 1 et 4 pour abaisser le pH.



D'après Bordas 2012

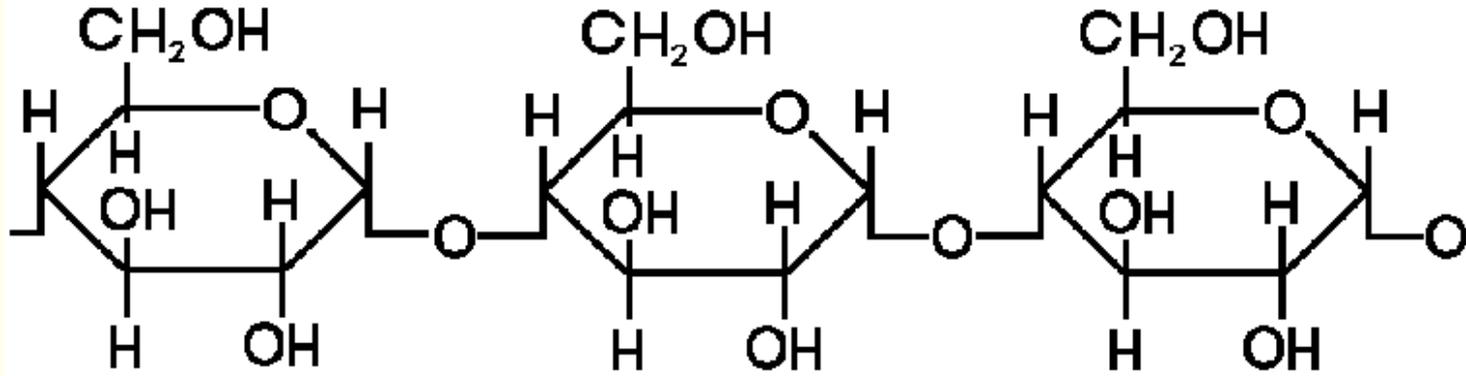
Tube	Composition
1	Ovalbumine + pepsine
2	Ovalbumine + amylose
3	Ovalbumine + eau
4	Amidon + pepsine
5	Amidon + amylose
6	Amidon + eau

**Une enzyme n'accepte qu'une seule classe de substrat (classe de molécule) souvent un seul substrat (molécule = une espèce chimique)**

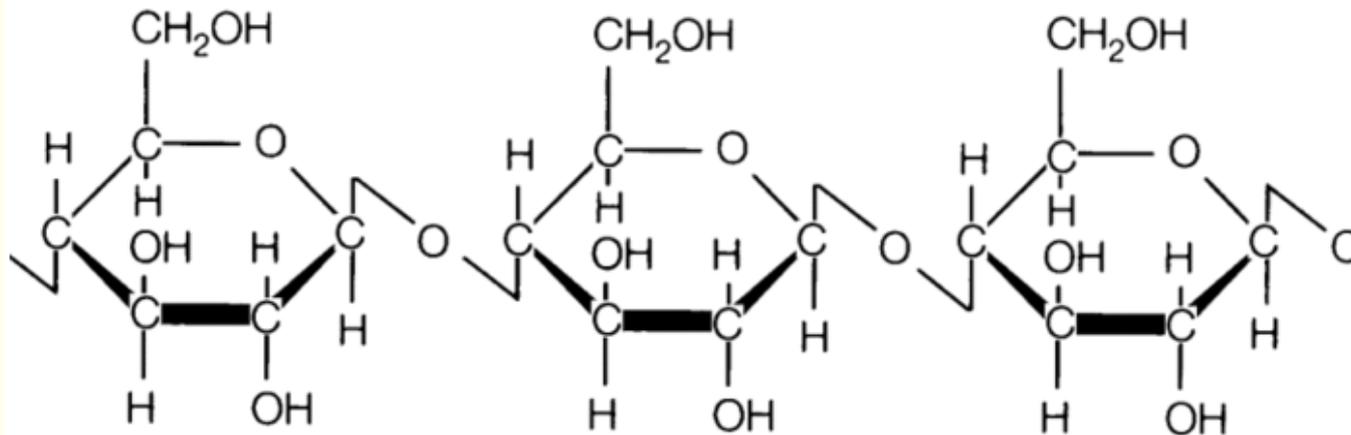
## T3-a-2 La double spécificité enzymatique ~ la spécificité de substrat

Amidon + amylase salivaire → Maltose + amylase salivaire  
 Cellulose + amylase salivaire → Cellulose + amylase salivaire  
 Cellulose + cellulase → Cellobiose + cellulase

Amidon  
 +  
 Amylase  
 salivaire  
 humaine

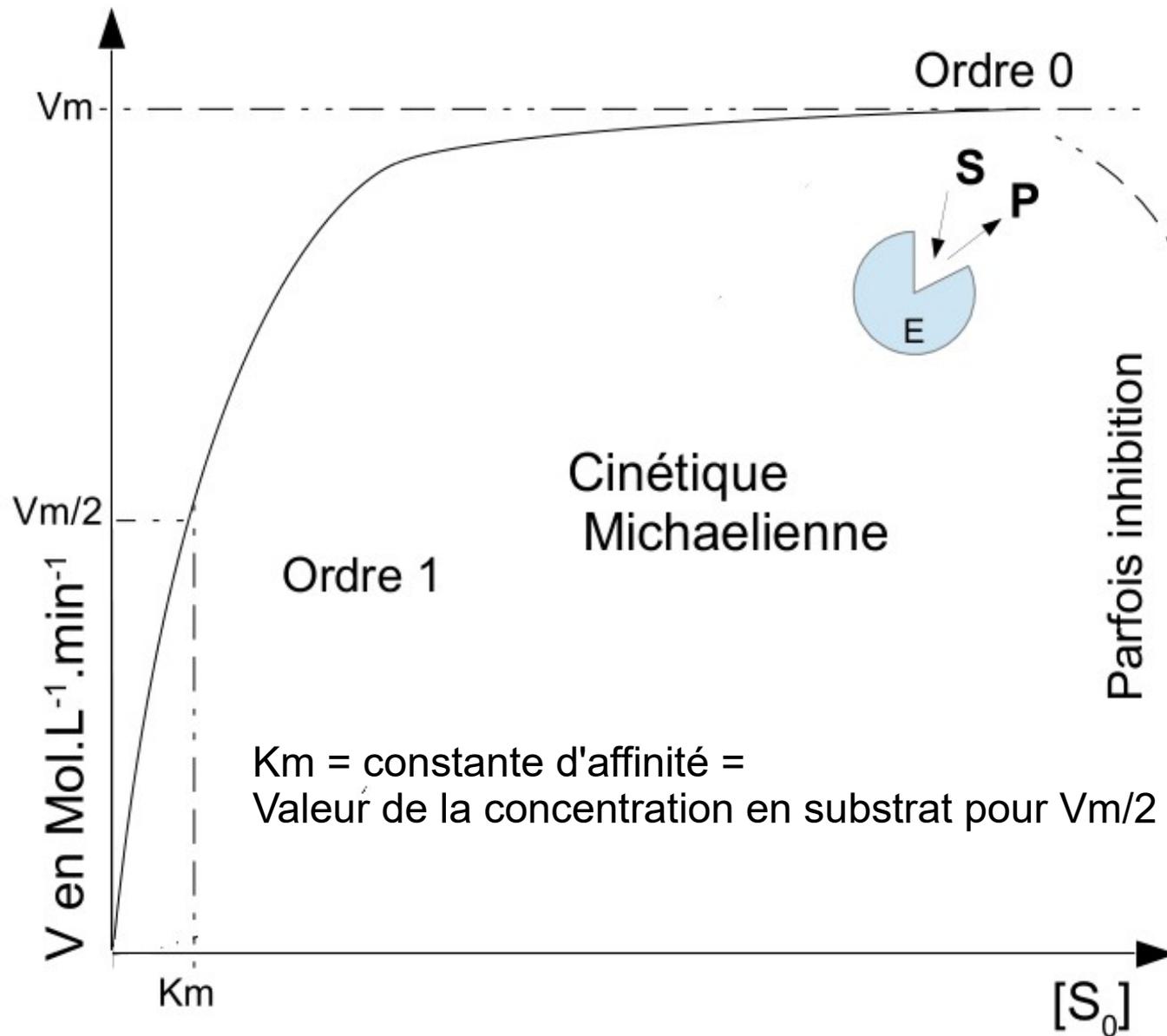


Cellulose  
 +  
 cellulase  
 (organisme  
 unicellulaire)



**La spécificité de substrat peut dépendre de la géométrie d'une liaison covalente!**

## T3-a-2 La double spécificité enzymatique ~ la spécificité de substrat



Courbe  $V=f([S_0])$

$$(1) V_{\text{imax}} = \frac{V_m \times [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

**Rappel: La saturation par le substrat suggère l'existence d'un nombre fini de sites réactionnels disponibles à un instant t.**

## T3-a-2 La double spécificité enzymatique ~ la spécificité de substrat

Belin spéSVT 2012 Activités 3, 4, 5 p 157 + TP + Bordas 2012 Exercice Acarbose

Justifier (argumenter) l'écriture suivante:

**Site actif**  
=  
**site de fixation (reconnaissance)**  
+  
**Site réactionnel**

**Une enzyme présente une double spécificité;**

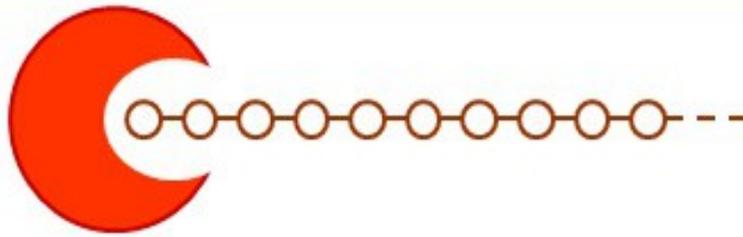
- **spécificité de substrat**
- **spécificité de réaction**

**en relation avec la conformation du site actif qui, quant à elle dépend de la séquence des ac. aminés**

## T3-a-2 La double spécificité enzymatique ~ la spécificité de réaction

### Modes d'action des polysaccharidases

Exo = Attaque l'extrémité de la chaîne



Un produit d'hydrolyse

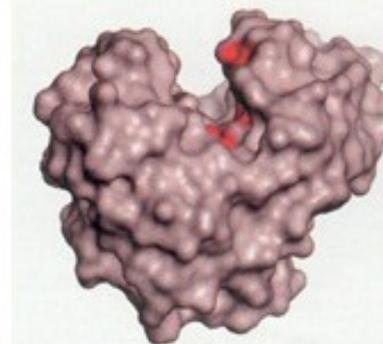


Topologie poche  
alpha-amylase / maltose

Endo = Attaque aléatoire



Produit statistique

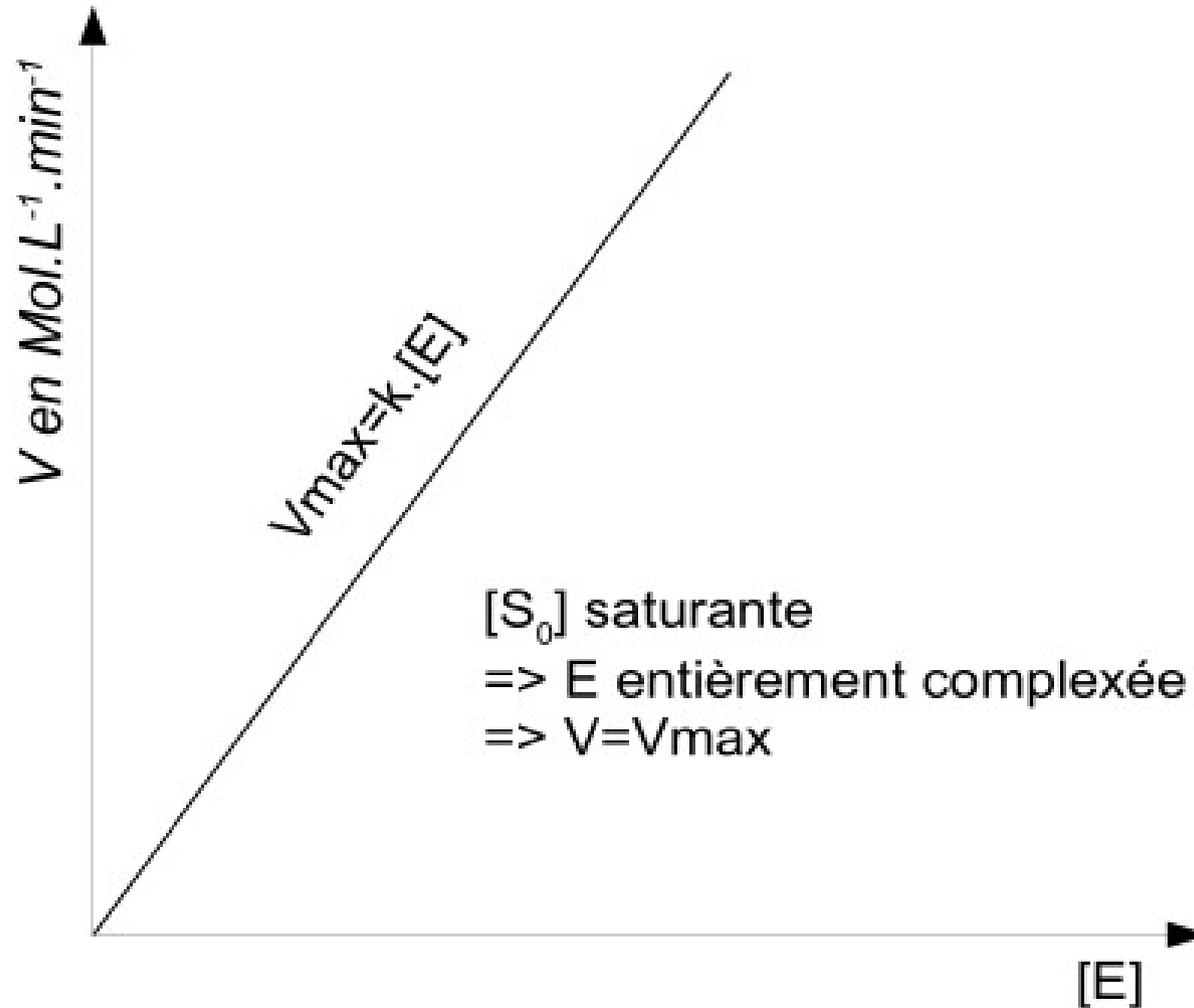


Topologie sillon  
Endo-amylase / dextrines

*jm d'après phycocolloïdes-Diane-2007*

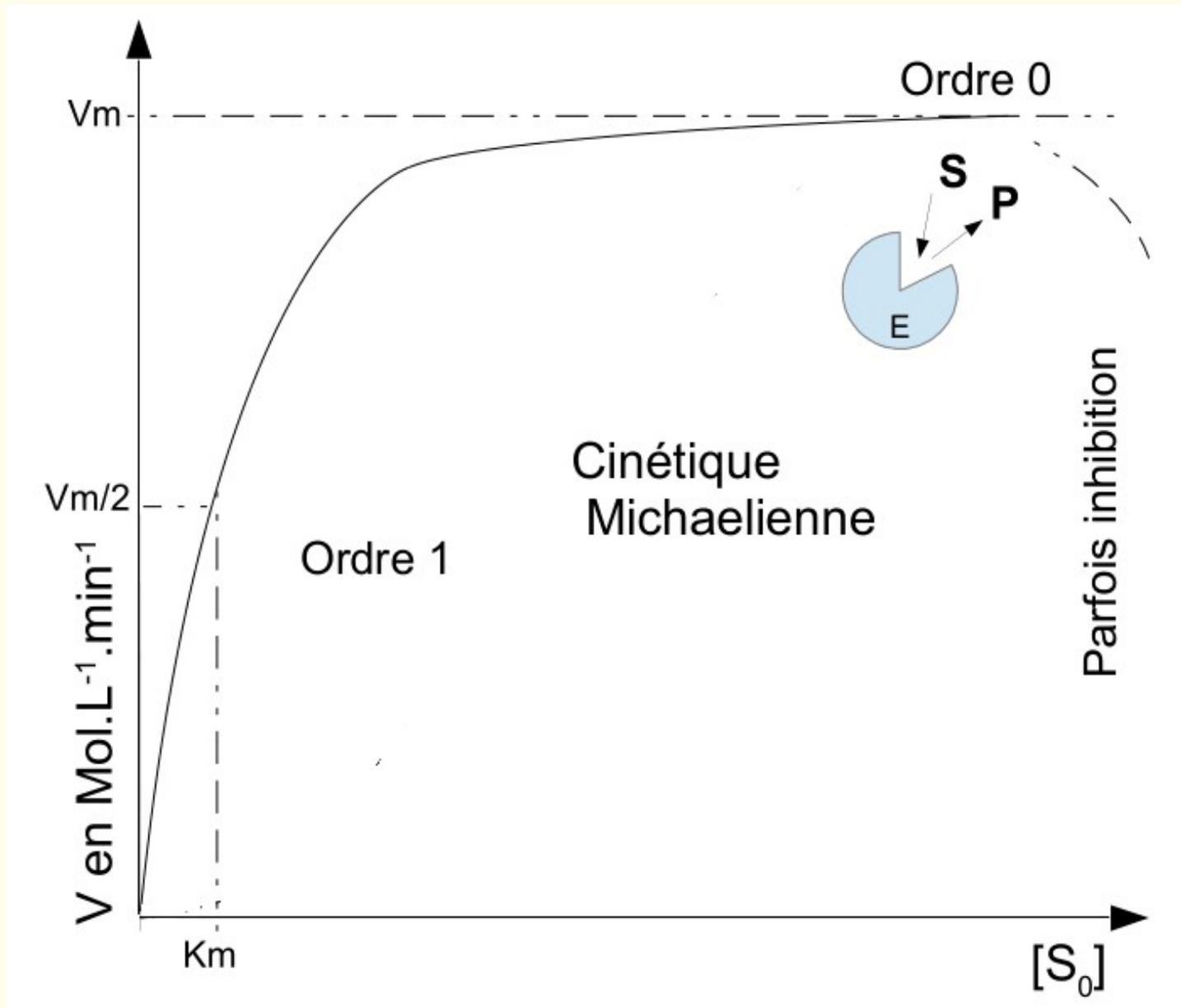
**La spécificité de réaction (de produit) peut, elle aussi être en relation avec la conformation (topologie) du site actif.**

## T3-a-3 Les paramètres de la cinétique enzymatique



Pour un organisme augmenter [E] permet d'accélérer la production d'un métabolite

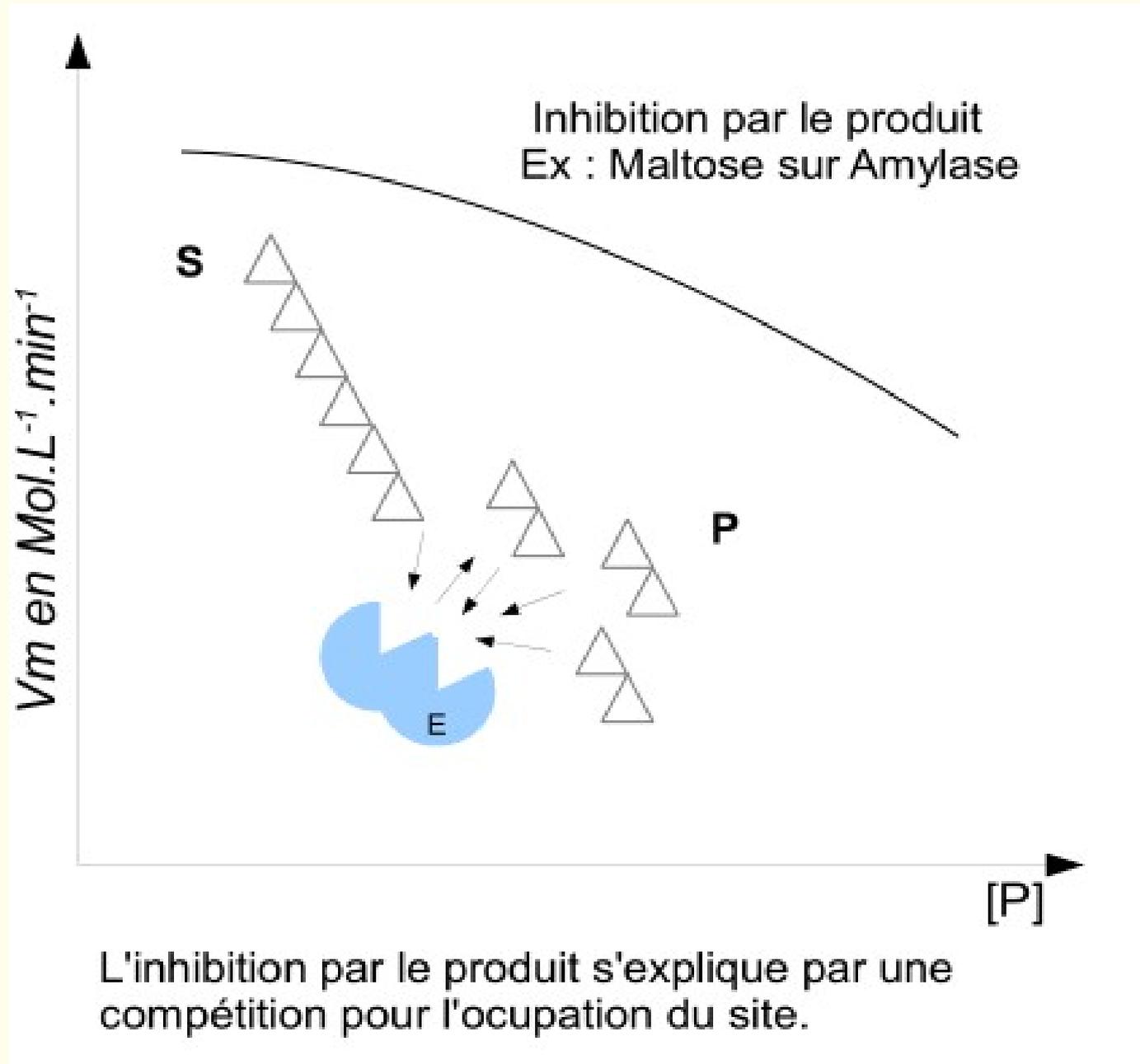
## T3-a-3 Les paramètres de la cinétique enzymatique



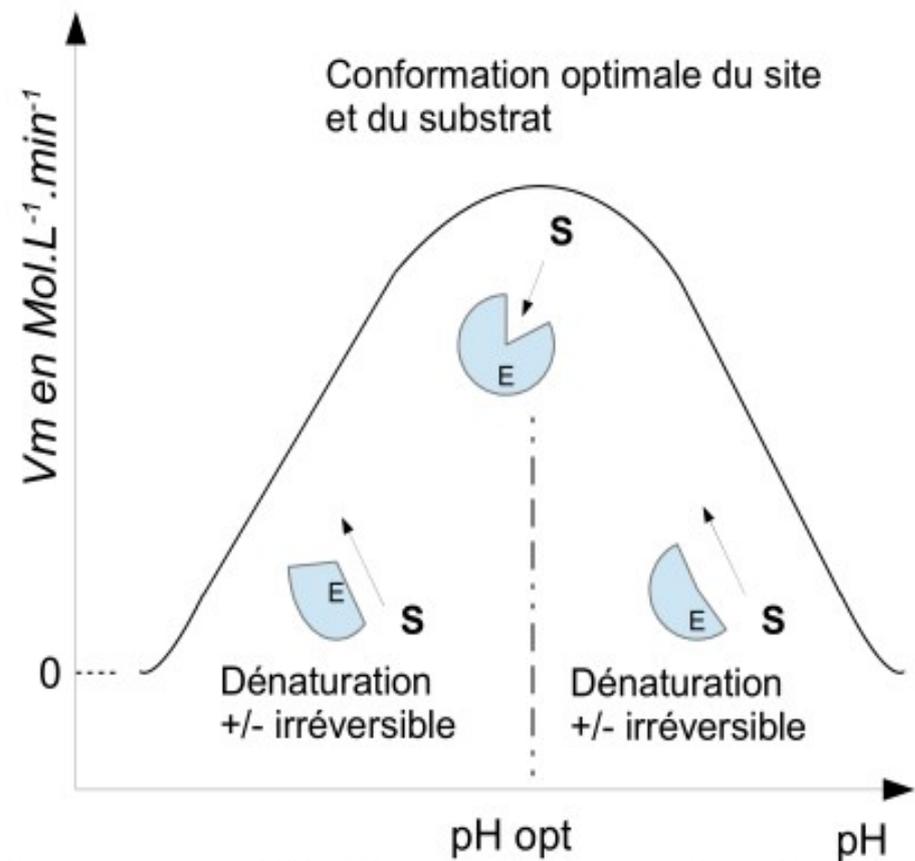
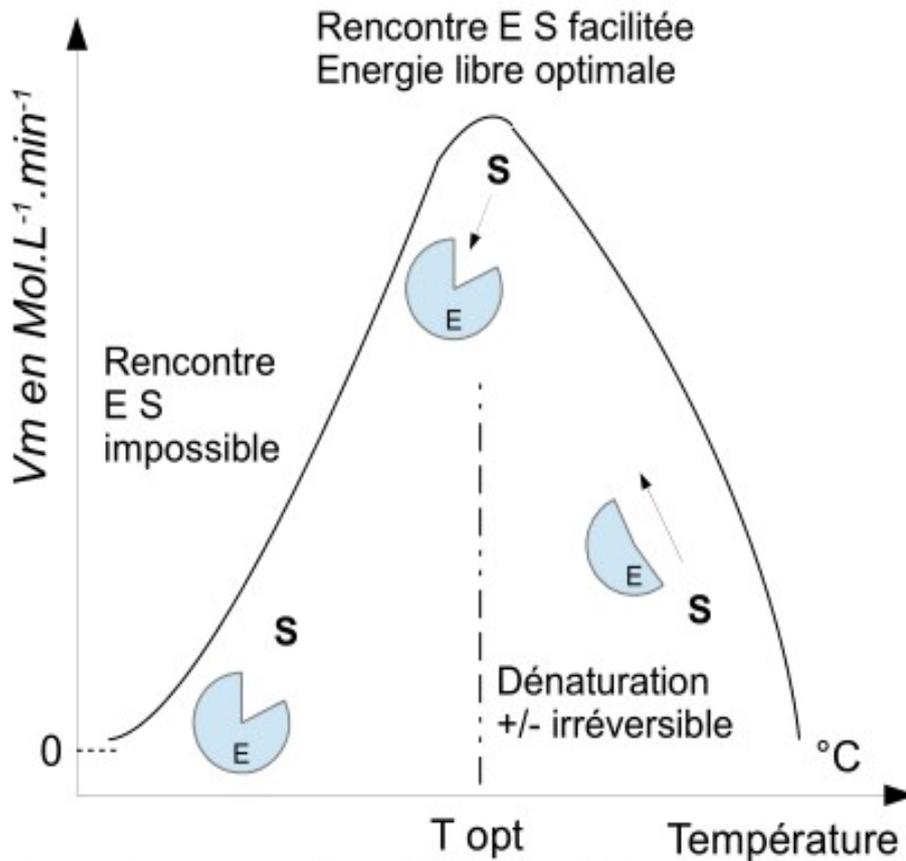
**Courbe  $V=f([S_0])$**

$$(1) V_{\text{imax}} = \frac{V_m \times [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

## T3-a-3 Les paramètres de la cinétique enzymatique



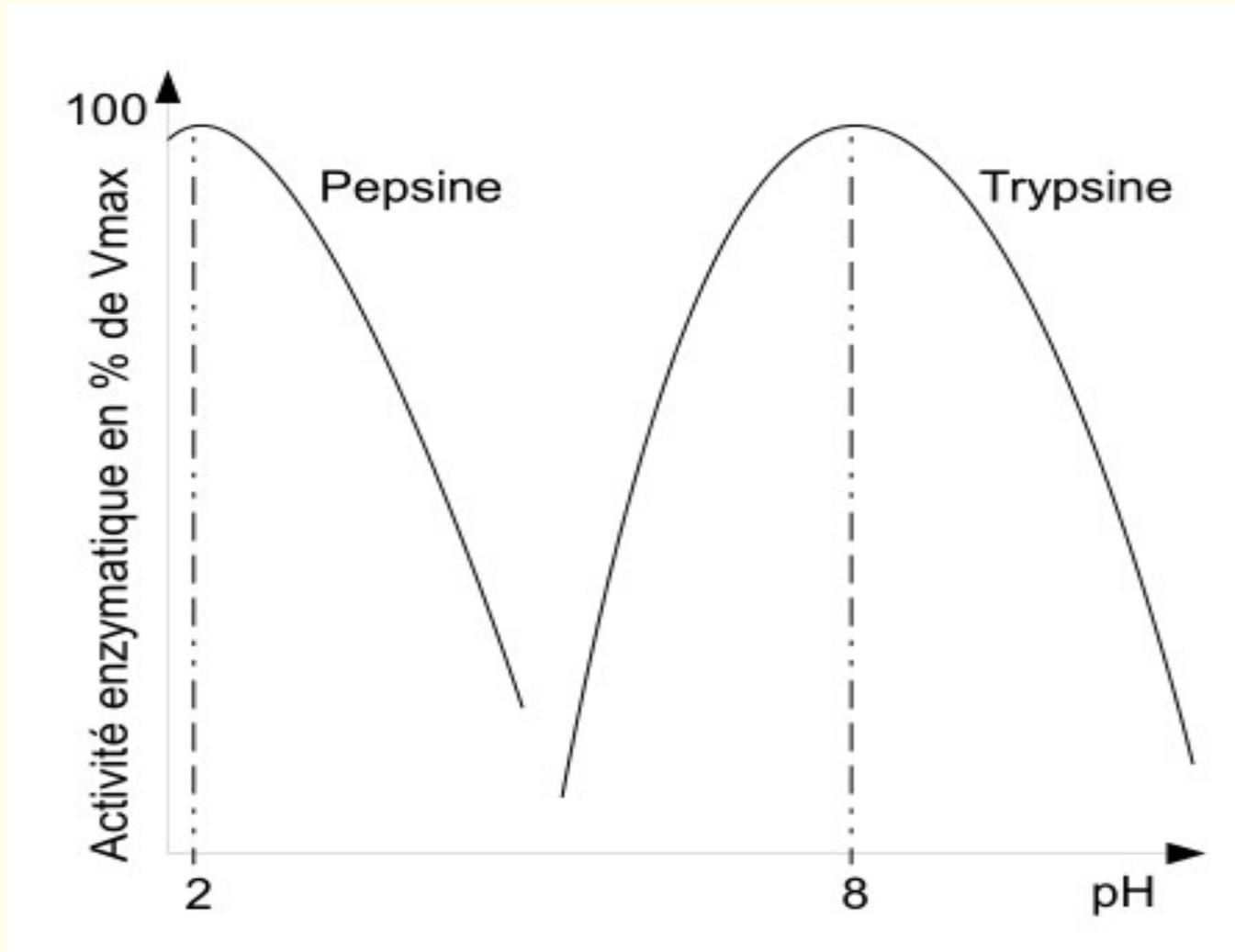
## T3-a-3 Les paramètres de la cinétique enzymatique



Température et pH modifient l'activité enzymatique principalement en modifiant les charges des radicaux ionisables des acides aminés (modification de la conformation de l'enzyme), ou en provoquant la formation de liaisons covalentes (dénaturation irréversible ; coagulation)

La sensibilité à la température et au pH dépend des radicaux des acides aminés donc de la séquence de la protéine enzymatique donc des allèles des gènes et de l'épissage.

## T3-a-3 Les paramètres de la cinétique enzymatique



## T3-a-3 Les paramètres de la cinétique enzymatique

Les enzymes sont les "outils" moléculaires du vivant.

Elles présentent une double spécificité: Spécificité de substrat / Spécificité d'action

Leur activité dépend des conditions de température et de pH qui elles mêmes peuvent dépendre de l'activité physiologique de l'organisme.

