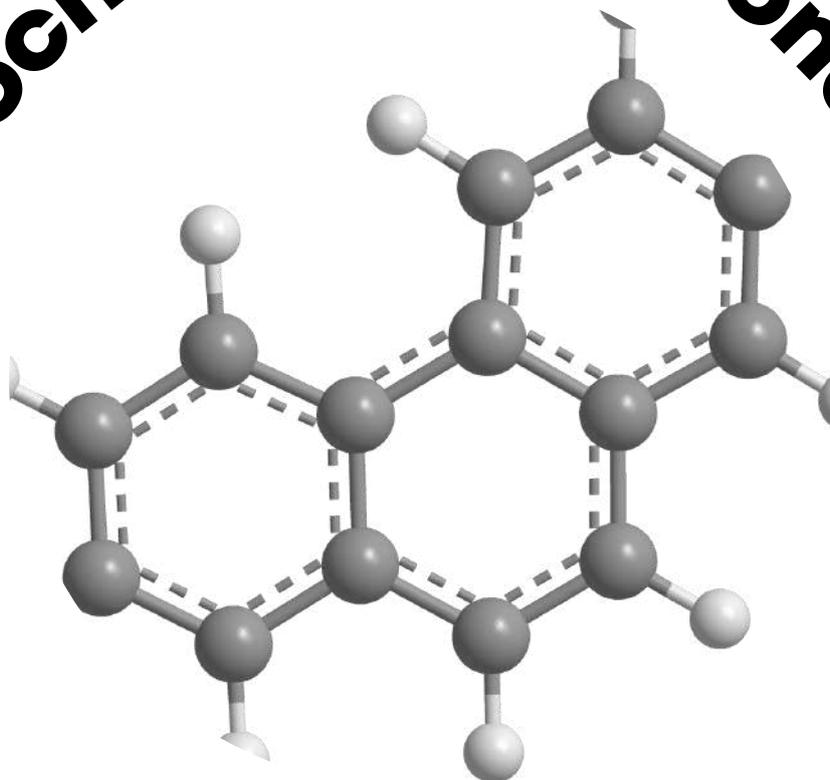


Biochimie Approfondie



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

Université Moulay Ismail
Faculté des Sciences
Meknès

COURS DE BIOCHIMIE
APPROFONDIE : ENZYMOLOGIE

Pr. HAJJI

Année Universitaire 2019 - 2020

Les Enzymes

1 - Introduction – Définitions

2 - Les cofacteurs enzymatiques

A - biotine (ou vitamine B8)

B - Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺)

3 - La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

B - catalyse enzymatique

C - notion de site actif

D - introduction à la cinétique enzymatique

E – mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule

ENZYMES

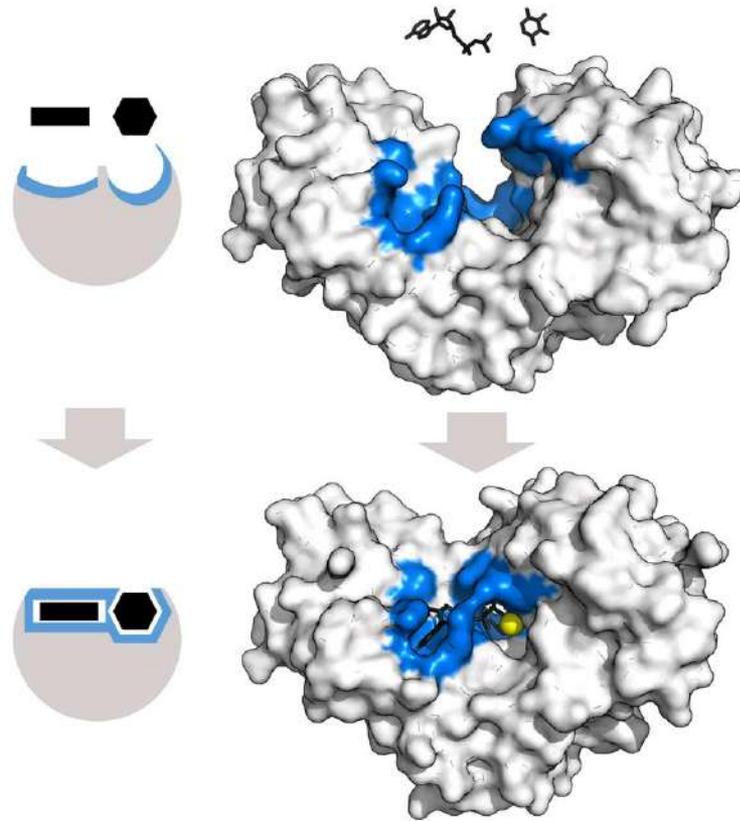
- **Introduction**

Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité fonctionnelle remarquable. Ils accélèrent les réactions métaboliques d'un organisme vivant. En effet, ils ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions spontanées et interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction.

- Les enzymes catalysent plus de 5 000 réactions chimiques différentes.
- L'ensemble des enzymes d'une cellule détermine les voies métaboliques possibles dans cette cellule.
- L'étude des enzymes est appelée enzymologie.
- Les enzymes permettent à des réactions de se produire des millions de fois plus vite qu'en leur absence.
- Un exemple extrême est l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase, qui catalyse en quelques millisecondes une réaction qui prendrait, en son absence, plusieurs millions d'années.

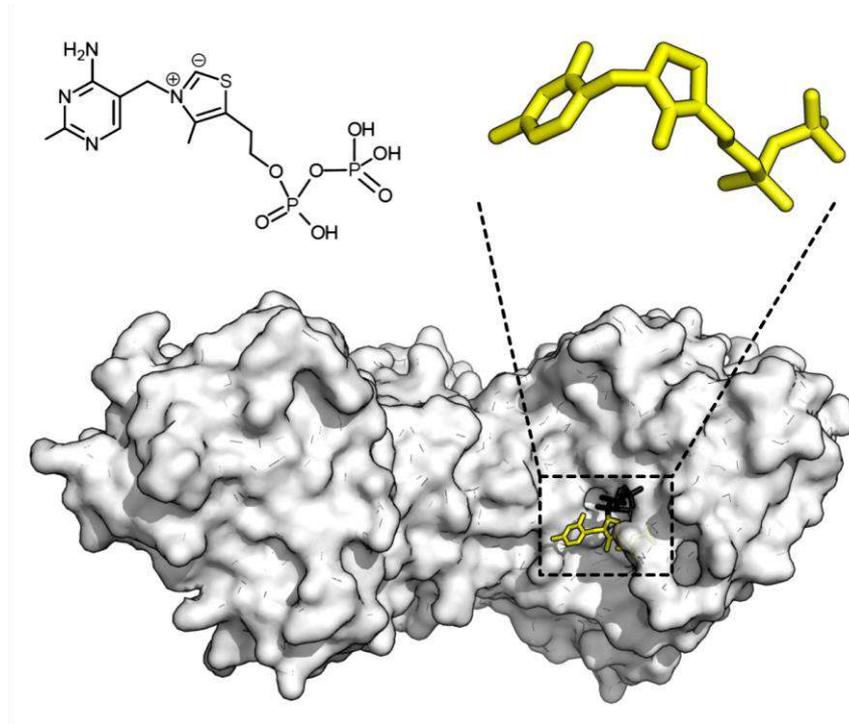


Exemple: l'hexokinase



Le site actif des enzymes change de forme en se liant à son substrat. L'hexokinase présente l'adénosine triphosphate et le xylose dans son site actif. Les sites de liaison sont représentés en bleu, les substrats en noir et le cofacteur Mg²⁺ en jaune.

Structure de la transcétolase



Enzyme impliquée dans de la [voie des pentoses phosphates](#), représentée avec son [cofacteur thiamine pyrophosphate](#) (TPP) en jaune et son [substrat xylulose-5-phosphate](#) en noir.

Enzyme : catalyseur spécifique

Site actif

Site de reconnaissance du substrat

Site de catalyse enzymatique

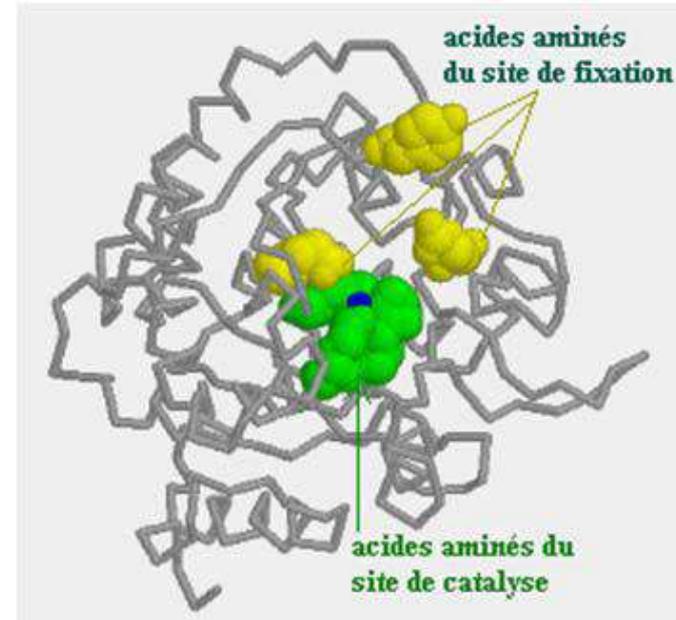
AA nécessaires :

Formation ou clivage liaisons

Reconnaissance de substrat(s) spécifique(s)

Cavité tri-dimensionnelle

1. Taille réduite / taille des enzymes
2. Fente ou cavité en général apolaire (hydrophobe)



Nomenclature et classification

Les enzymes sont classés selon la réaction qu'ils catalysent.

- Chaque enzyme est caractérisé par un **nom usuel** simple (exemple: carboxypeptidase A)
- un **nom systématique** plus informatif de la réaction catalysée (exemple: peptidyl-L-aminoacide hydrolase)
- un **numéro de code** à quatre chiffres précédé de EC (EC « **Enzyme Commission** » exemple: 3.4.17.1)

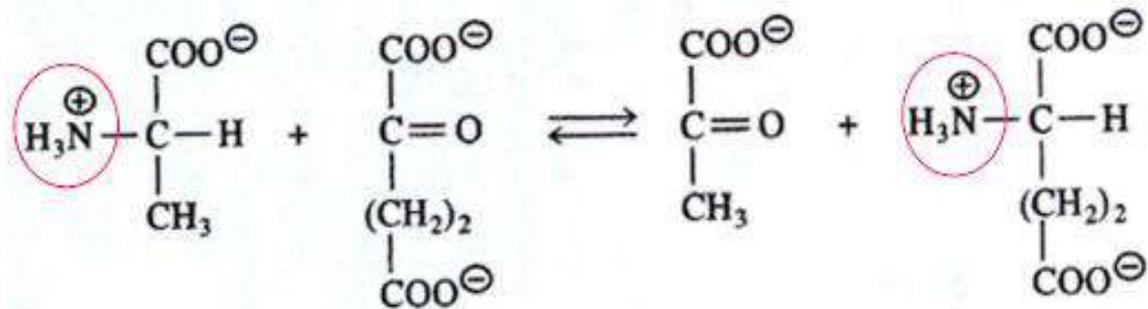
Nomenclature et classification

- Classification des enzymes selon le type de réaction catalysée
 - Les 6 types de réactions
 - Nomenclature internationale des enzymes

(2) **Transférases** : réactions de transfert de groupe,
nécessite un coenzyme

Soit l'enzyme soit le coenzyme sont substitués par covalence avec un
groupe du substrat

Alanine aminotransferase (transaminase) : transfert de groupe aminé



L-alanine

α -cetoglutarate

pyruvate

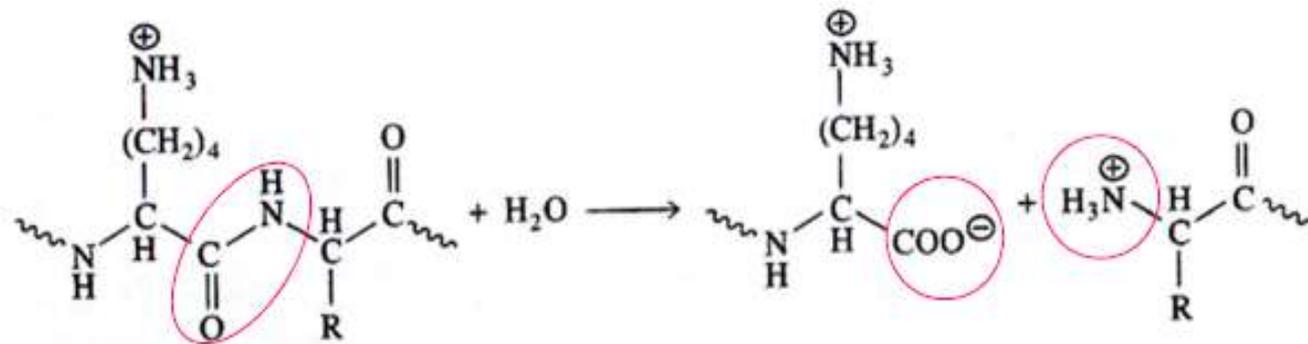
L-glutamate

Coenzyme : phosphate de pyridoxal (PLP), dérivé de la vitamine B6

(3) Hydrolases : réactions d'hydrolyse

Classe particulière de transférase, l'eau étant l'accepteur du groupe transféré

Protéases : trypsine hydrolyse des liaisons Lys-x ou Arg-x ou x=Pro



Pas de coenzyme, parfois un cofacteur ion métallique

(4) **Lyases** : réactions d'élimination non hydrolytiques non oxydantes ou lyse

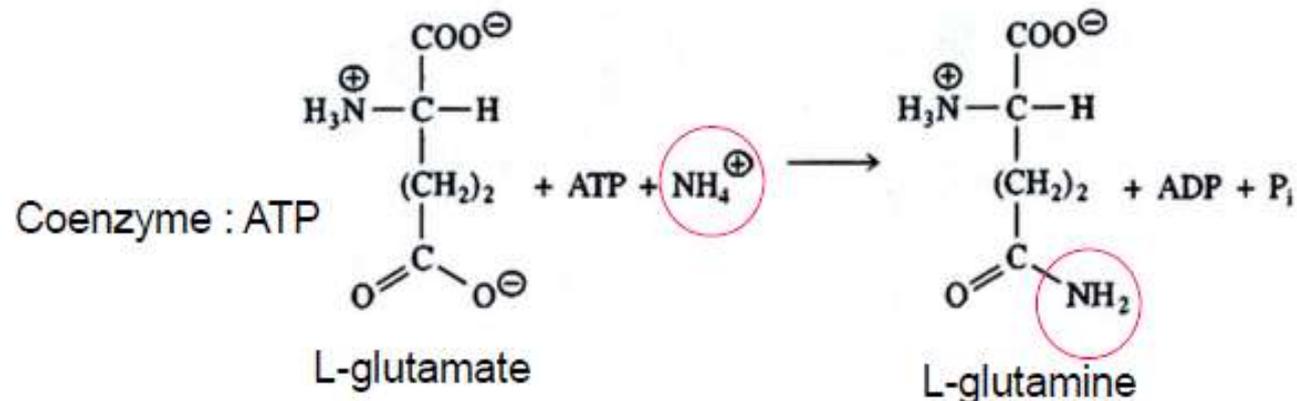
(5) **Isomérase**s : réactions d'isomérisation

Simple car un seul substrat, un seul produit

À l'origine de la compréhension de la cinétique enzymatique

(6) **Ligases (synthétases)** : union (ligation) de 2 substrats avec apports d'énergie d'un nucléoside triphosphate, ATP

Glutamine synthétase : synthèse ATP dépendante de la L-glutamine



Nomenclature

EC 1

Oxidoreductases

EC1.1,....

EC 2

Transferases

EC 3

Hydrolases

EC 3.1 Acting on ester bonds

EC 3.2 Glycosylases

EC 3.3 Acting on ether bonds

EC 3.4 **Acting on peptide bonds (peptidases)**

EC 3.4.1

....

EC 3.4.21 **Serine endopeptidases**

EC 3.4.21.1 **chymotrypsin**

.....

EC 3.5 Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds

EC 3.6 Acting on acid anhydrides

EC 3.7 Acting on carbon-carbon bonds

....

EC 4

Lyases

EC 5

Isomerases

EC 6

Ligases

Le premier chiffre indique le type de réaction en jeu.

Ces réactions sont classées en six groupes (classes) :

1. oxydoréductase (Réaction oxydation – réduction)
2. transférase (Transfère des groupements fonctionnels)
3. hydrolase (Réactions hydrolytiques)
4. lyase (Réaction d'élimination pour former des liaisons doubles)
5. isomérase (Isomérisation)
6. ligase Union de molécules couplée avec l'utilisation de nucléotides tri-phosphoré

1 – Introduction – Définitions

Chez tous les organismes vivants, les réactions chimiques sont catalysées par des molécules de **nature protéique** que l'on appelle **enzymes**.

Un ou une enzyme est un **catalyseur** biologique.

Une enzyme **accélère** la transformation d'une ou de plusieurs molécules en une ou plusieurs autres molécules.

Les molécules transformées s'appellent **substrats** et les molécules obtenues sont appelées **produits**.

2 – Les cofacteurs enzymatiques

Le cofacteur d'une enzyme est une molécule qui **apporte un groupement chimique important pour la catalyse enzymatique**, groupement que ne possède pas forcément l'enzyme seule.

Il peut s'agir d'un **ion** ou d'un **coenzyme** (**impliqués directement dans la catalyse**).

Il y a 2 familles de coenzymes :

- **transitoirement** liés à l'enzyme → **co-substrats** faiblement liés à l'enzyme (**coenzymes rédox NAD, FAD, Groupements hémiques**)

- **liés de façon covalente** à l'enzyme → **groupements prosthétiques** fortement liés à l'enzyme. (**partie du site actif catalytique thiamine phosphate pyridoxal-phosphate...**)

2 – Les cofacteurs enzymatiques

Apoenzyme
(Nature protéique)

(inactif)

+

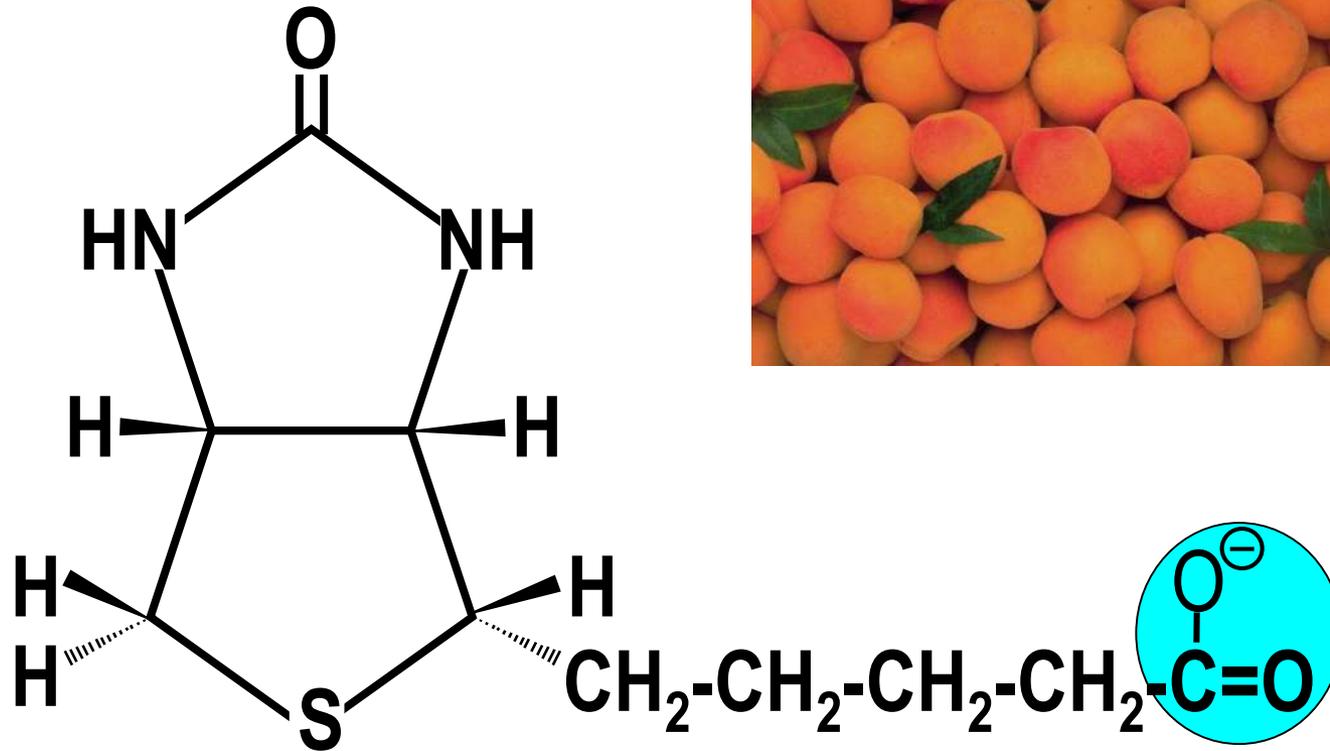
Cofacteur
(composé chimique non protéique)
(Ions métalliques ou coenzymes)



Holoenzyme
(Enzyme associée à son ou ses coenzymes)
(actif)

2 – Les cofacteurs enzymatiques (coenzyme R)

A - biotine (ou vitamine B8)



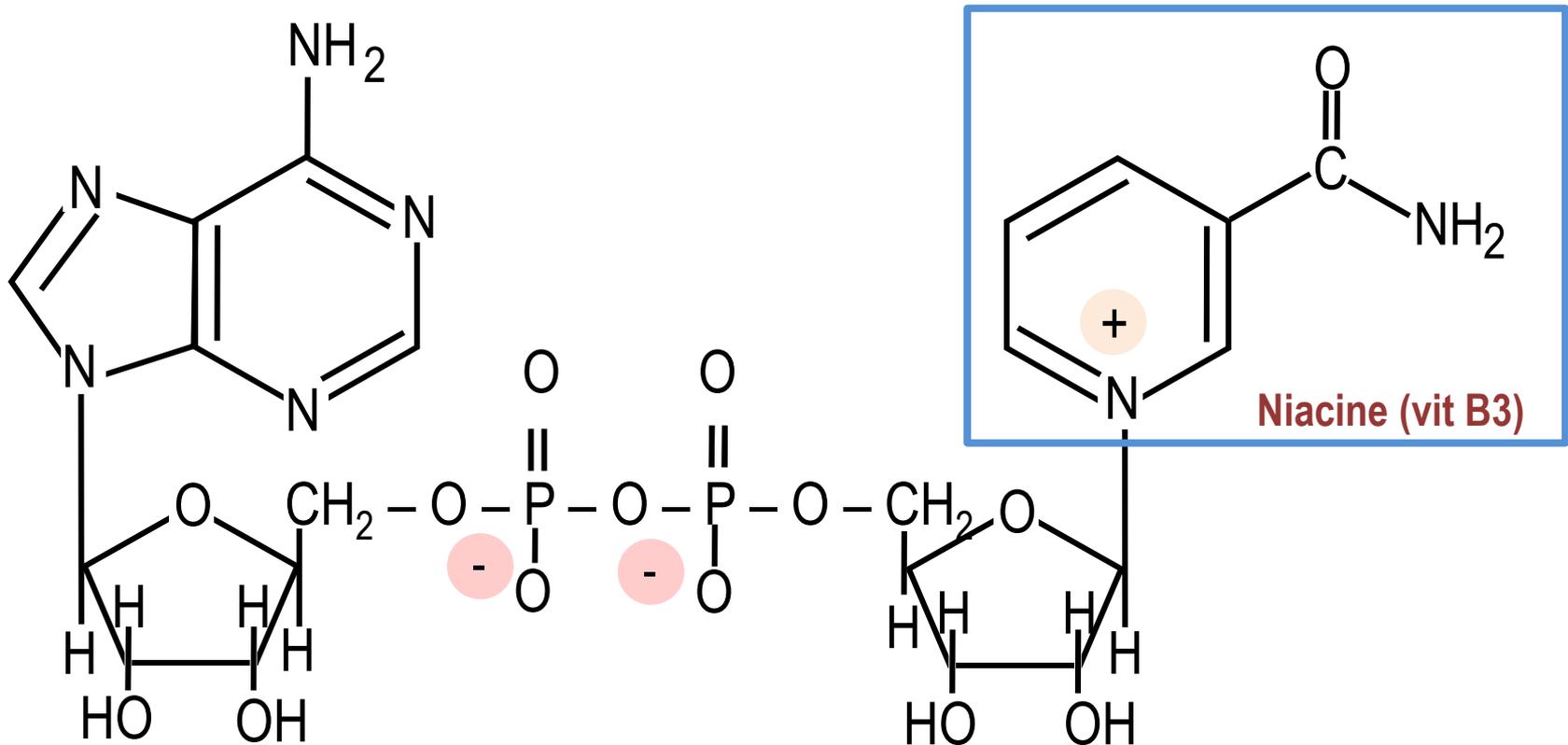
Liaison avec fonction
amine d'une lysine

Retrouvée dans les réactions de carboxylation (ajout d'une fonction acide carboxylique)

La **B8** est **incorporée** dans la structure d'un **coenzyme** (biotinyl-AMP), indispensable à l'activité de plusieurs enzymes. métabolisme des protéines, des lipides et des glucides. **Biosynthèse des vitamines B9 et B12.**

2 – Les cofacteurs enzymatiques

B - Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺)



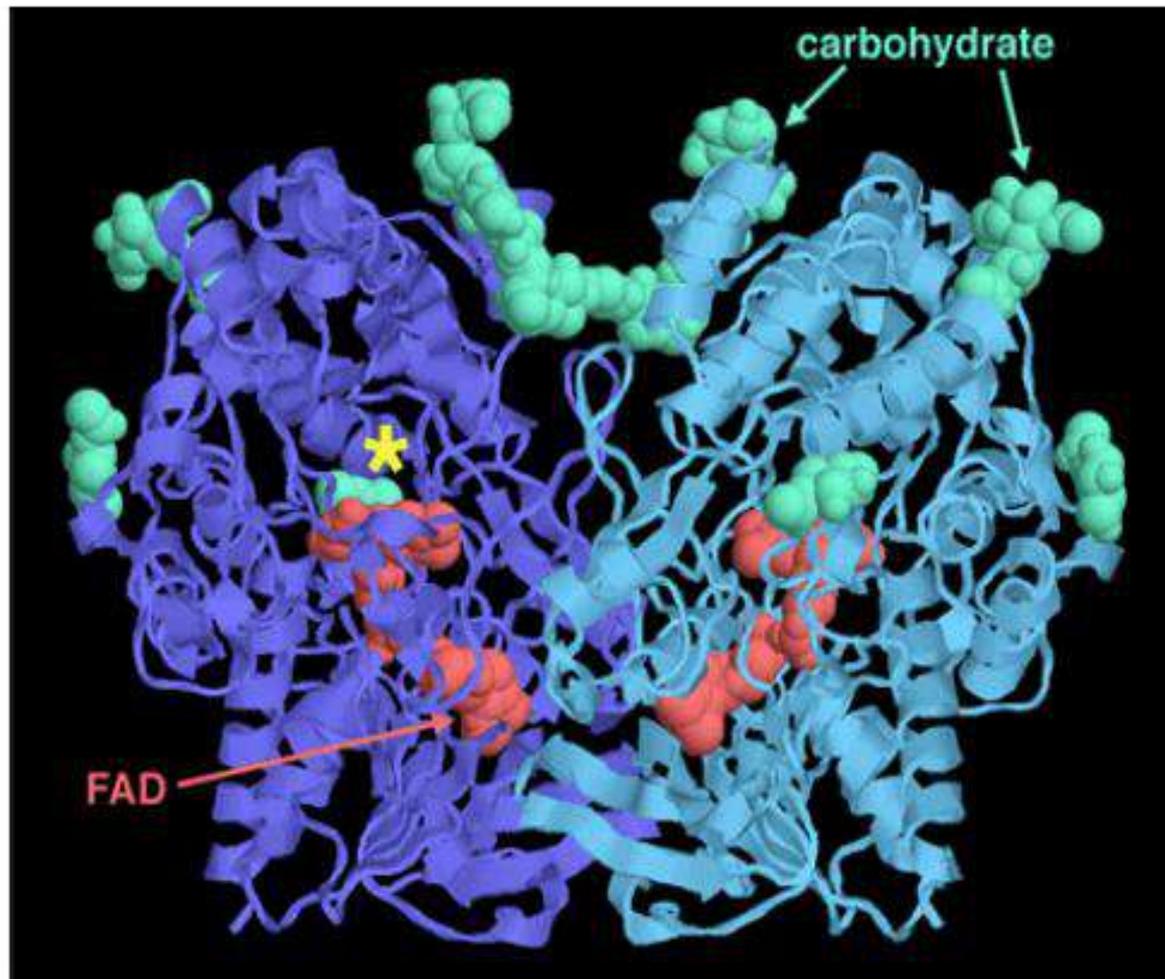
Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺)

Coenzyme présente dans toutes les cellules vivantes.

transporteurs d'électrons ou dans réactions oxydoréduction

Structure de l'enzyme

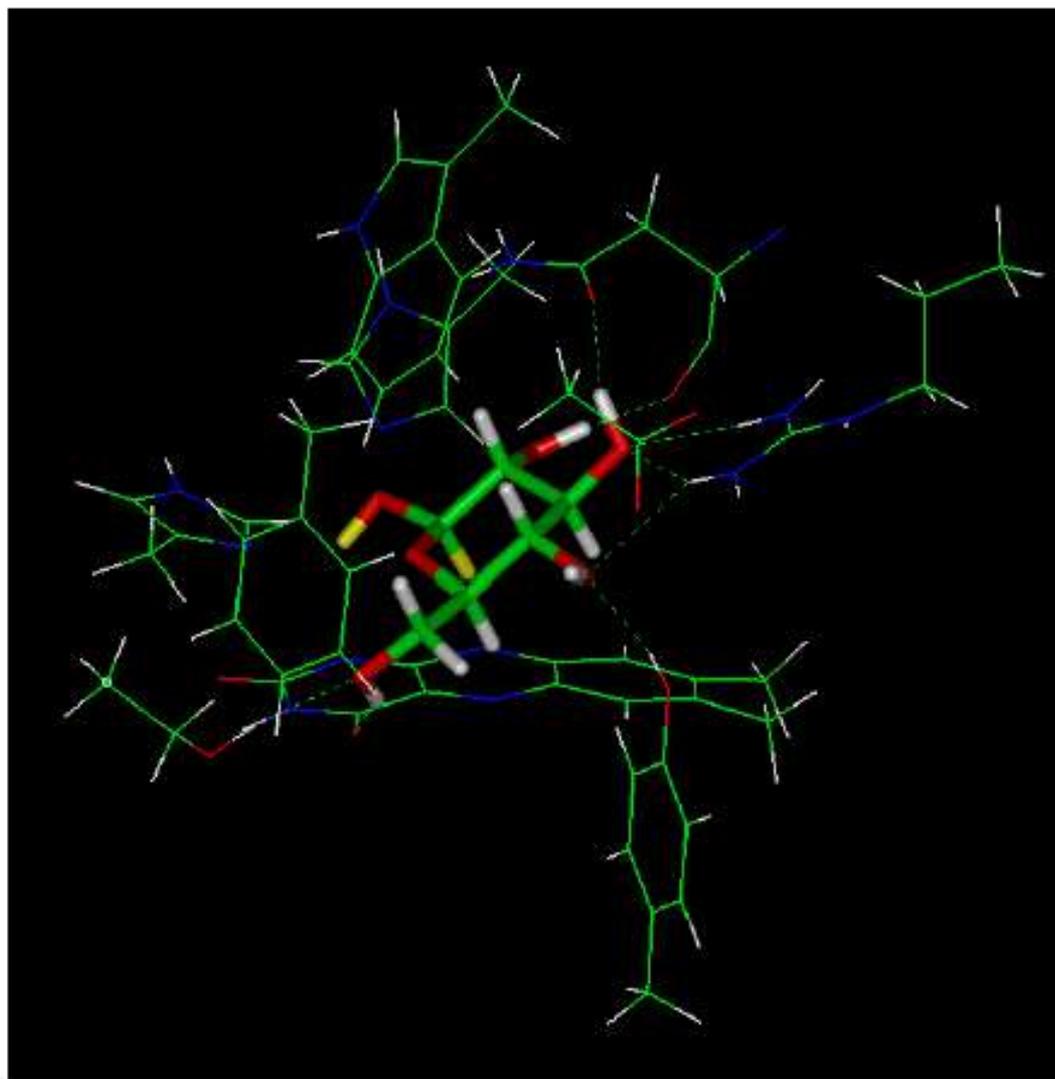
La glucose oxydase a été séquencée, cristallisée et observée aux RX. On en a déduit le modèle tridimensionnel ci-dessous. Le site actif (*) contient un coenzyme (du FAD) et une molécule de glucose juste au-dessus. L'enzyme est glycosylée (carbohydrates indiqués).



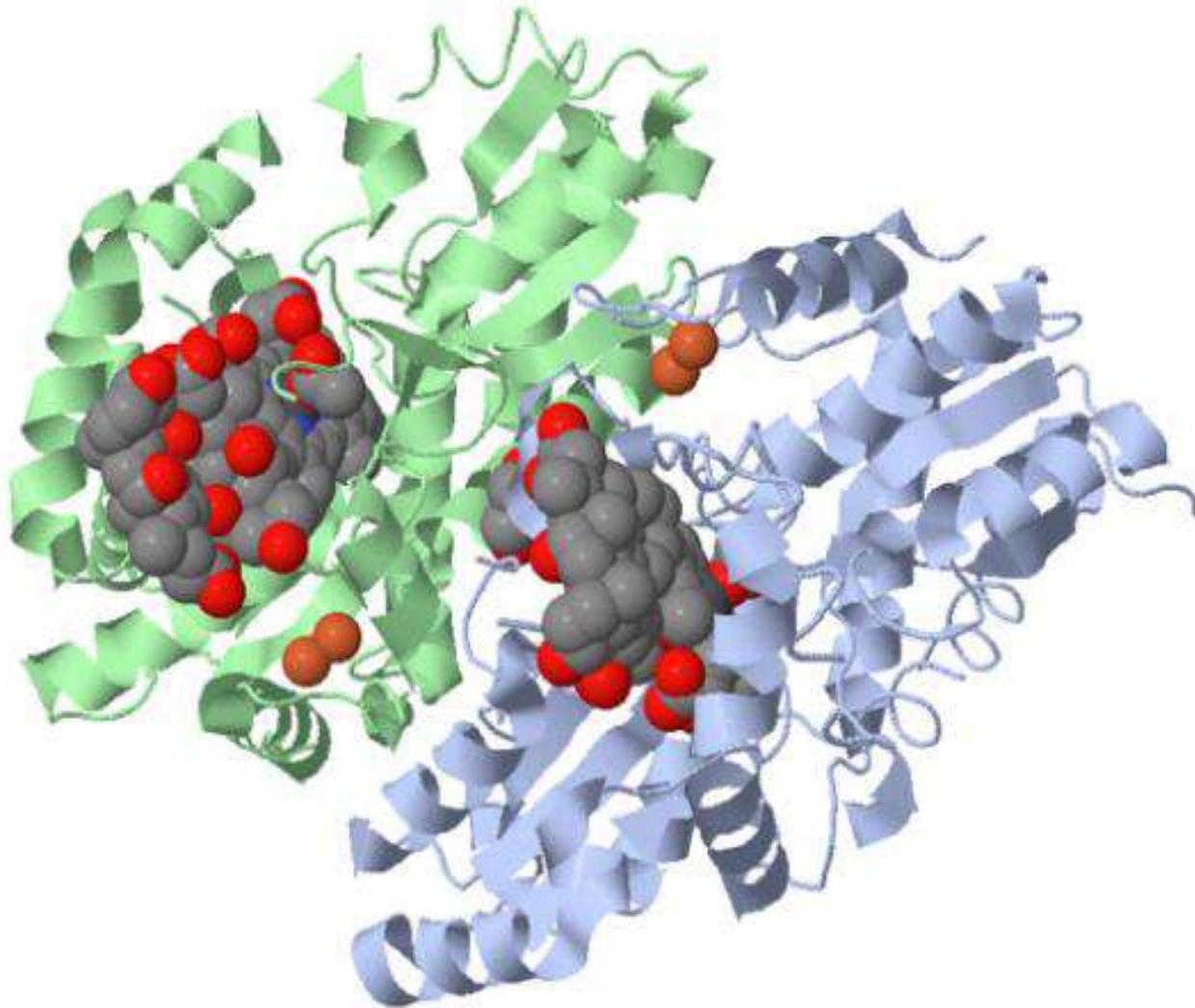
Structure de l'enzyme

La liaison entre la molécule de glucose et le site actif met en jeu des liaisons hydrogènes, comme visible sur le cliché ci-dessous. Ce sont essentiellement des atomes d'hydrogène du cycle du glucose qui établissent 9 liaisons H avec les résidus des acides aminés du site de liaison ainsi que 3 liaisons de type hydrophobes avec les acides aminés Tyr 68, Phe 414 et Trp 426.

Le carbone 1 et l'oxygène 1 (en jaune sur le document) sont alors proches du site actif constitué des acides aminés His 559 et His 516 (stabilisé par Glu 412).

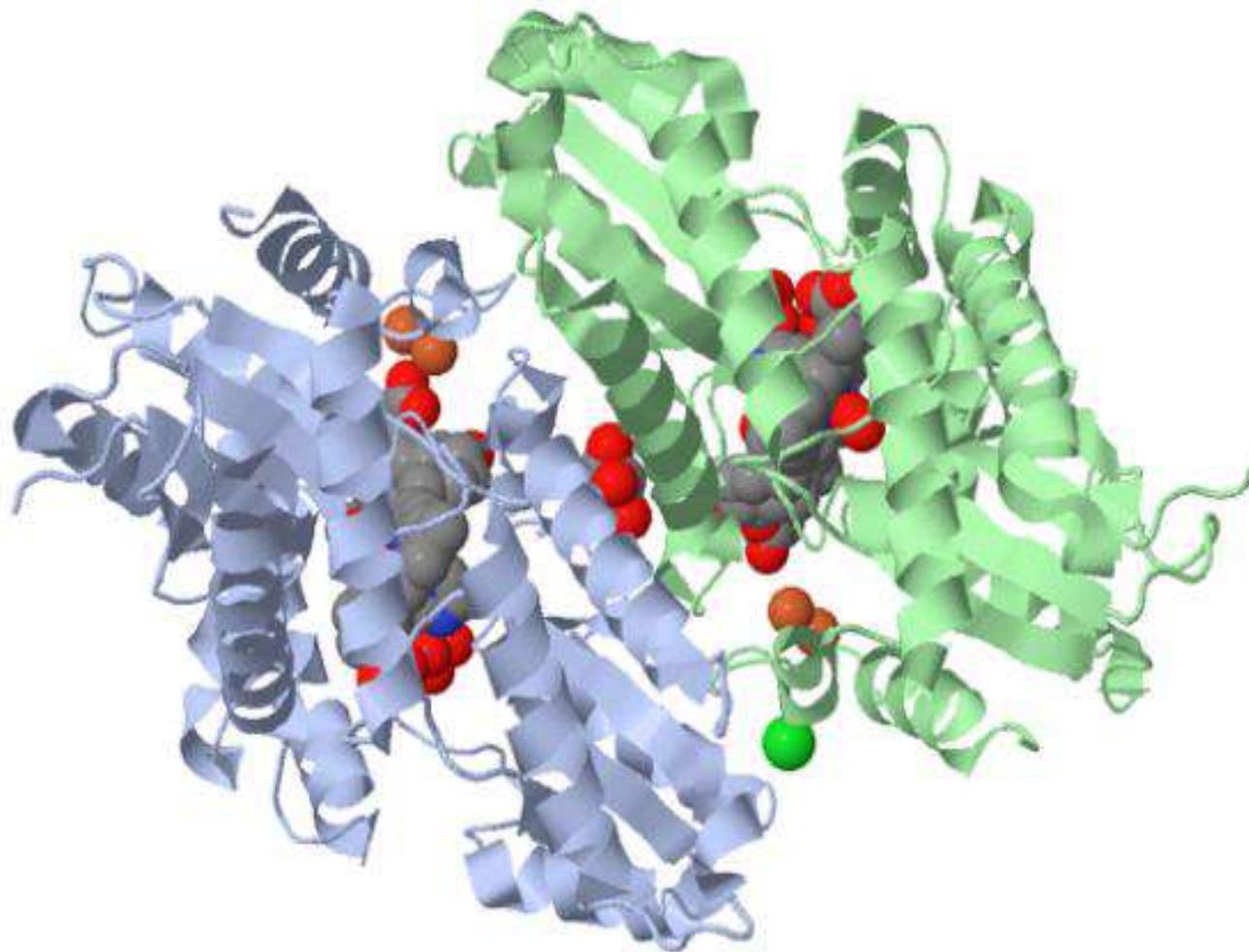


Structure de la ferrochélatase



Ferrochélatase en présence de ses substrats (porphyrine et 2 ions Fe^{2+} par site actif)

Structure de la ferrochélatase



Ferrochélatase en présence de ses substrats (prophyrine et 2 ion Fe^{2+}) et du plomb Pb^{2+}

3 – La réaction enzymatique

La transformation d'une molécule en une autre catalysée par un ou une enzyme s'écrit ainsi :



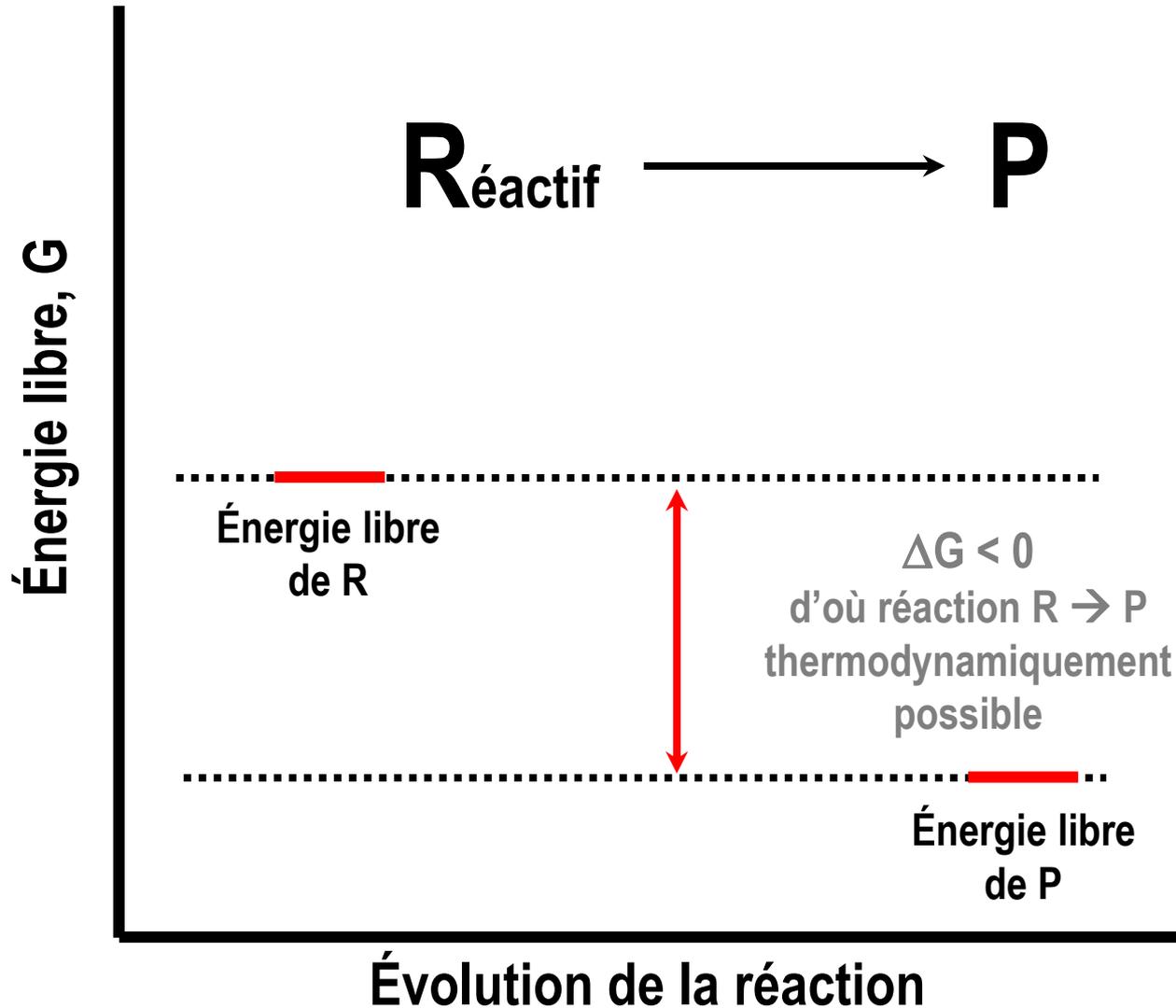
S : substrat

P : produit

E : enzyme

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée



3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

Attention, un $\Delta G < 0$ ne signifie pas que la réaction a lieu.

Cela signifie qu'elle est possible thermodynamiquement.

L'oxydation complète du saccharose par l' O_2 est très exergonique (ΔG très négatif) :



pourtant le sucre qui se trouve dans votre placard en contact avec l'oxygène de l'air ne s'enflamme pas en libérant de l'eau et du gaz carbonique.

La réaction est possible mais sans catalyseur elle se déroule à une vitesse imperceptible.

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

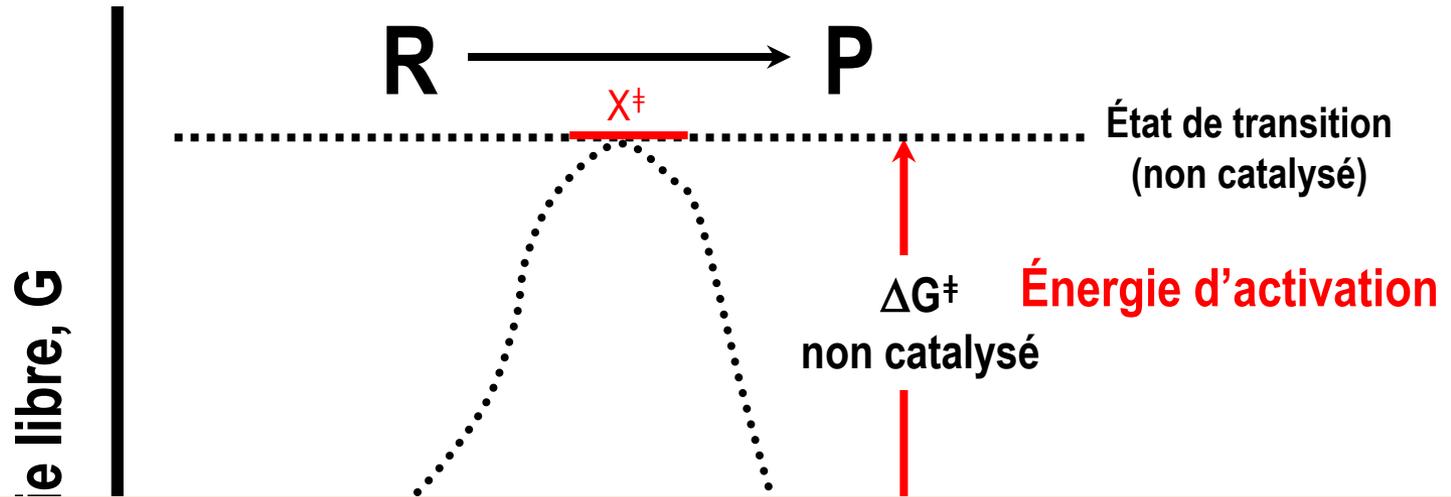
Pourquoi ?

Parce que la molécule R, pour se transformer en molécule P, doit passer une barrière d'énergie.

Cette barrière correspond à l'énergie thermique nécessaire pour que la molécule R soit en "position" correcte pour être transformée en molécule P, c'est à dire pour que R atteigne **son état de transition**.

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée



L'énergie libre de l'état de transition donne une idée de la vitesse de la réaction :

plus cette énergie d'activation est élevée, plus la vitesse de la réaction sera faible.

Évolution de la réaction

3 – La réaction enzymatique

A - réaction non-catalysée

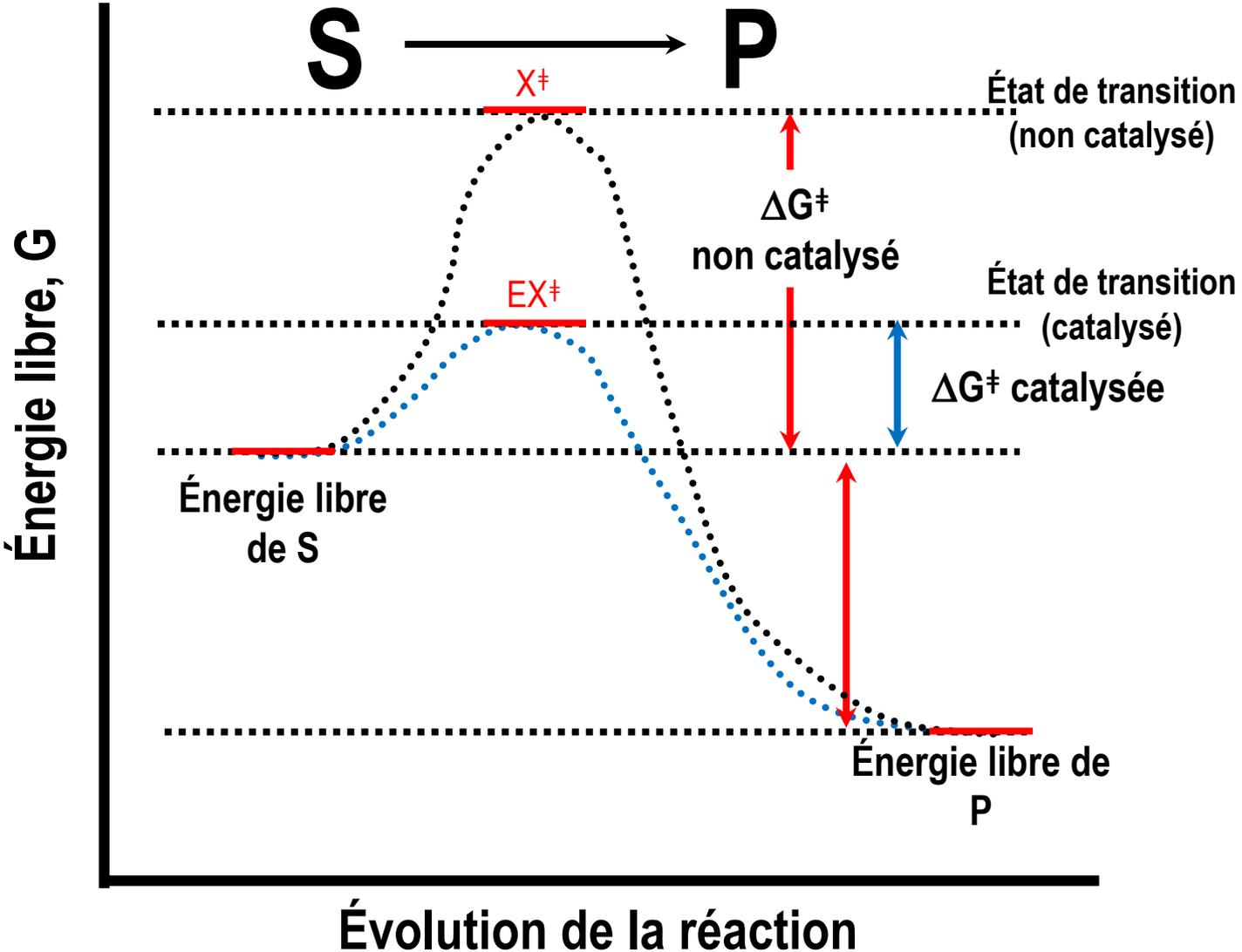
L'état de transition X^\ddagger n'est obtenu en quantité que **pour des températures très élevées.**

En conditions douces de température réaction probable que pour **un très faible nombre** de molécules (quelques réactions/sec ou moins) : **à notre échelle, on ne détecte rien!!**

L'enzyme, en fixant le substrat et en l'orientant de façon constante et optimale, abaisse l'énergie de l'état de transition.

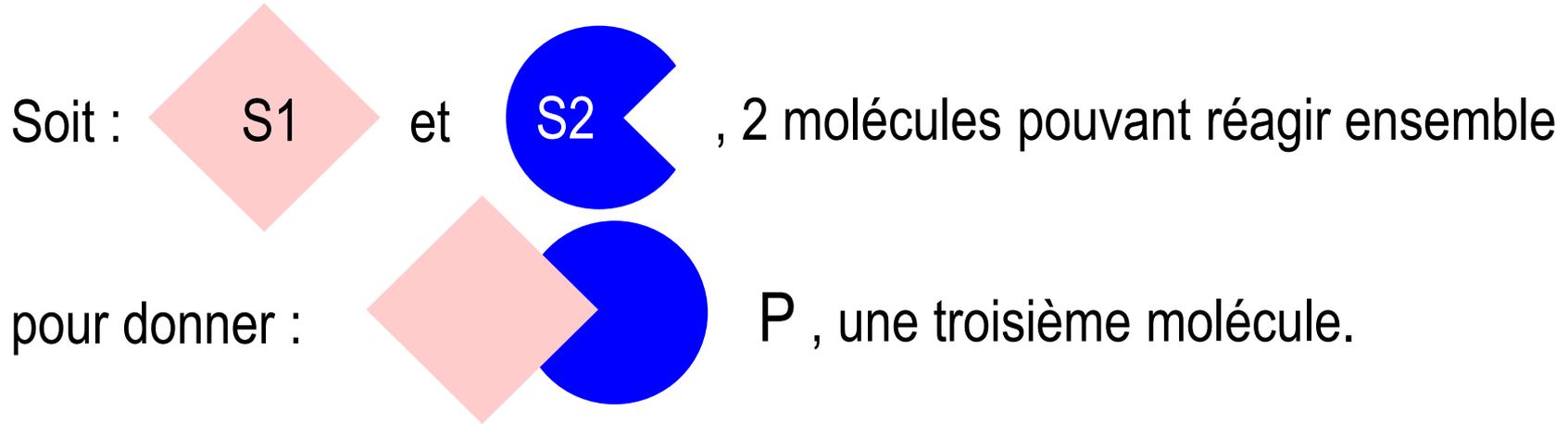
3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique



3 – La réaction enzymatique

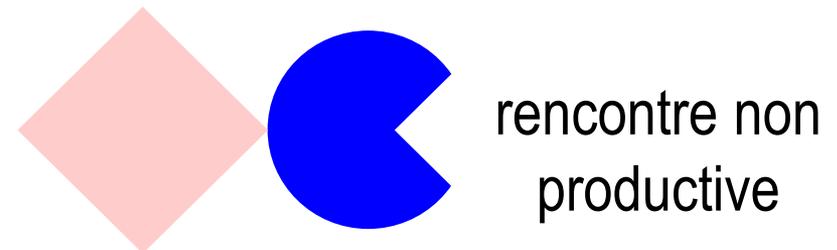
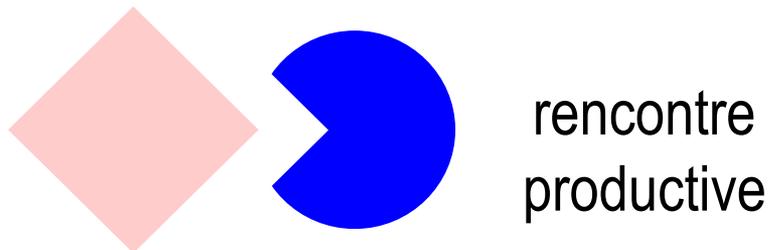
B - catalyse enzymatique



Le passage de $S1+S2$ à P est très favorable ($\Delta G < 0$).

Pour qu'il ait lieu, S1 et S2 sont mélangés.

Pour que les 2 molécules réagissent, elles doivent se rencontrer en un point bien précis :



3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

Probabilité d'avoir une rencontre productive (donc une réaction) faible.

Comment favoriser les rencontres productives ?

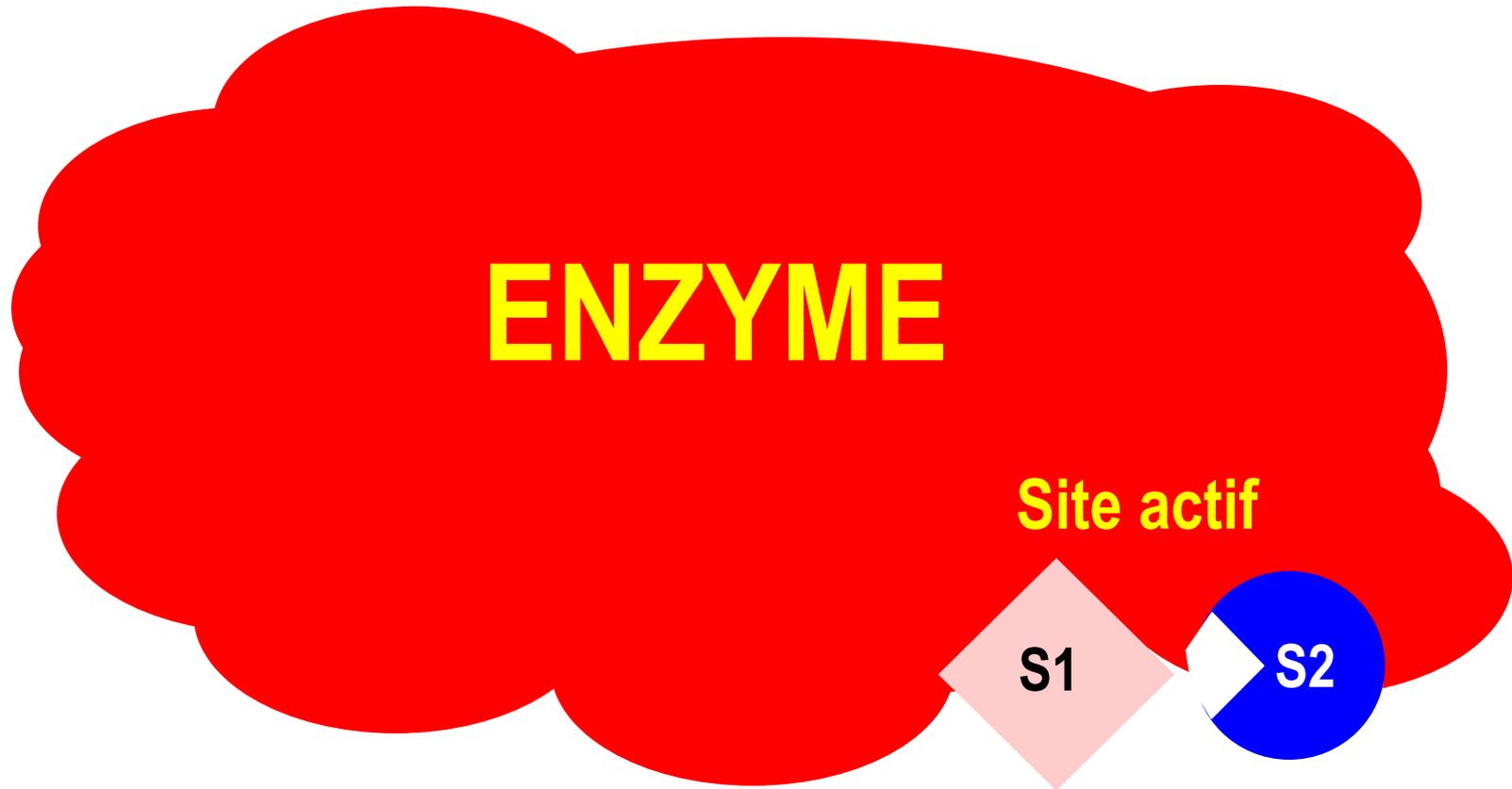
→ nécessaire d'augmenter le nombre total de rencontres en augmentant la température du milieu (agitation thermique).

Avec une enzyme, la situation est différente :

la protéine **fixe toujours de la même façon** les molécules S1 et S2, de manière à ce qu'elles soient toujours orientées de façon optimale.

3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique



3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

L'énergie thermique du milieu suffit à former le complexe enzyme-substrats : formes géométriques et propriétés physico-chimiques de ces molécules sont **complémentaires**.

Une fois formé, le complexe enzyme-substrat(s) a de fortes chances de fabriquer le produit final sans qu'il ne soit apporté au milieu une énergie calorifique élevée.

L'enzyme permet d'accélérer fortement la réaction **en augmentant la probabilité de rencontre productive** de S1 et S2 en les **fixant à proximité l'un de l'autre** dans son site actif.

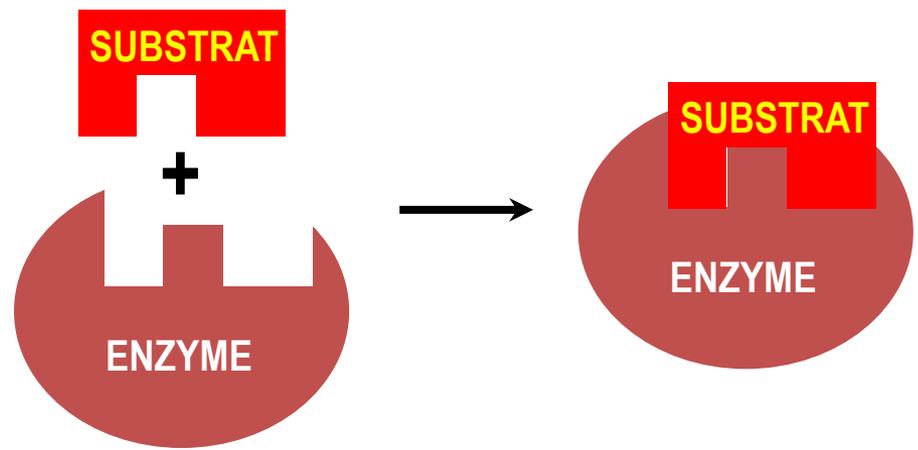
3 – La réaction enzymatique

B - catalyse enzymatique

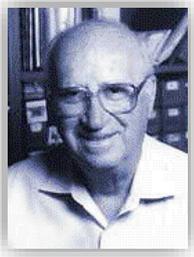
1894 MODELE DE FISHER : CLE-SERRURE



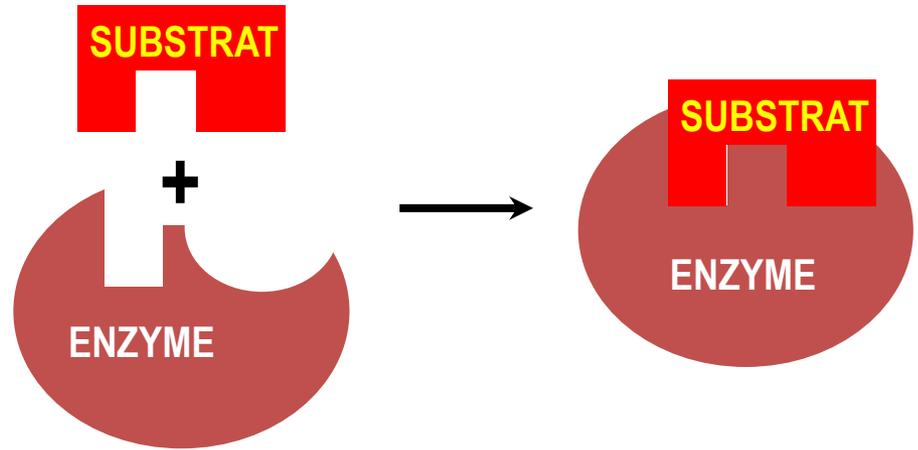
Hermann Emil Fischer



1958 MODELE DE KOSHLAND : AJUSTEMENT INDUIT



Daniel Koshland Jr.



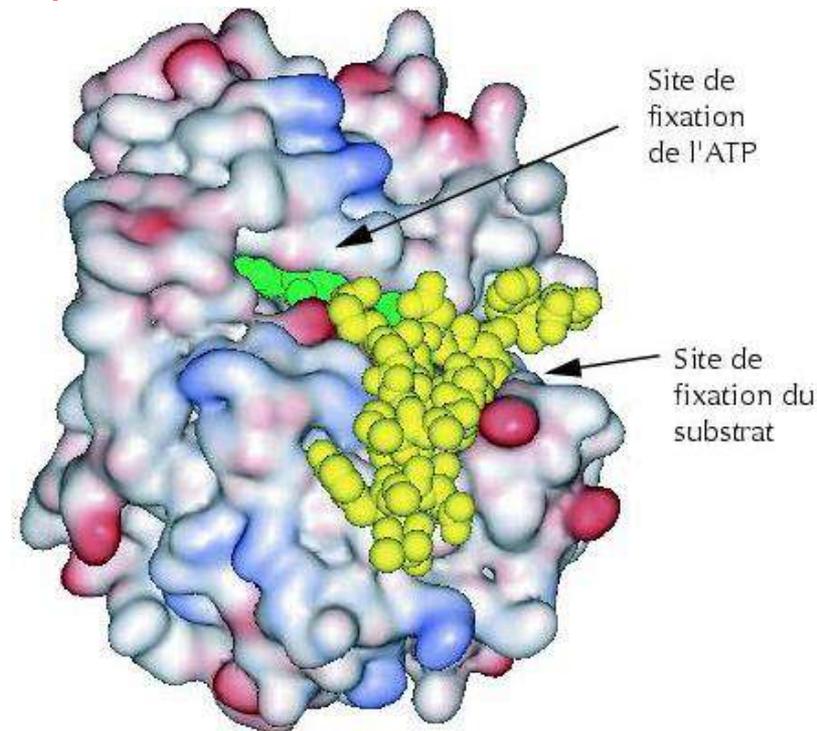
3 – La réaction enzymatique

C - notion de site actif

La structure 3D de l'enzyme fait apparaître une zone qui lie les substrats et permet leur réaction : **site actif ou site catalytique**.

Le site actif ou site catalytique est une poche taillée pour accepter un substrat particulier.

Le repliement de la chaîne polypeptidique a pour conséquence que le site actif est constitué d'acides aminés qui peuvent être parfois très éloignés les uns des autres dans la structure primaire.



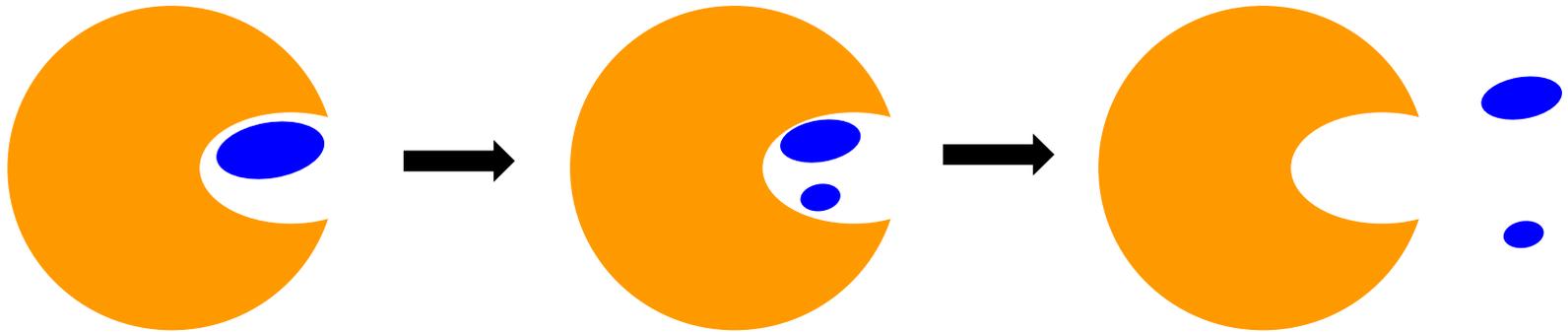
Protéine kinase A avec ATP en vert et peptide inhibiteur en jaune.

Rouge régions négatives et bleu régions positives.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Le substrat se fixe dans le site actif, il est ensuite modifié pour donner une ou plusieurs autres molécules appelées produits puis il y a relargage du ou des produits dans le milieu.



L'enchainement de ces évènements ne prend qu'une fraction de seconde (10^{-6} à 10^{-1} sec selon les enzymes).

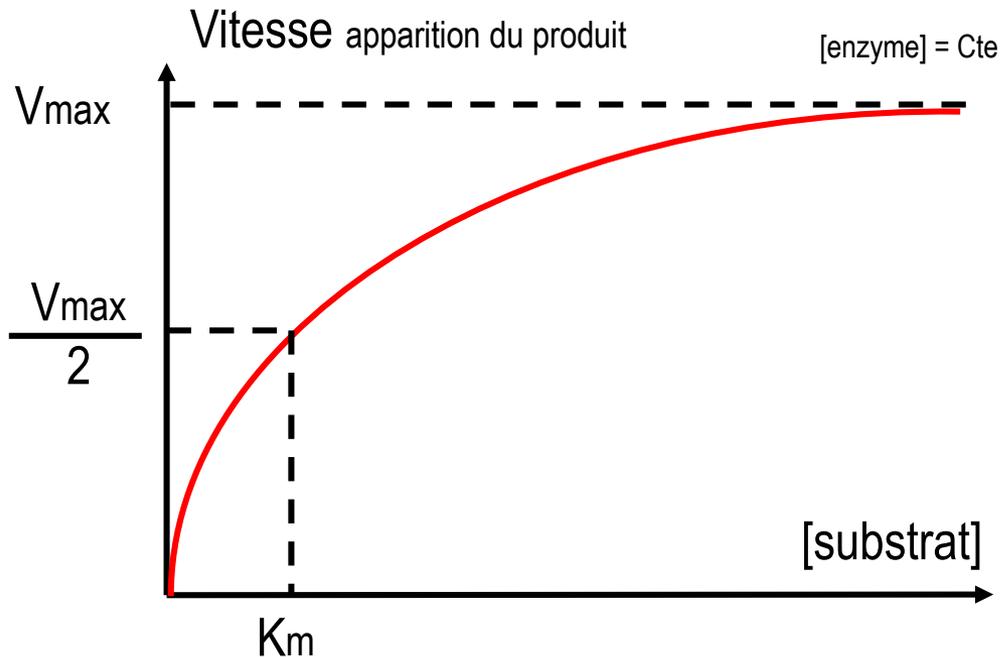
Pour une molécule d'enzyme donnée, le nombre de réactions catalysées par unité de temps est donc un nombre fini (de 10 à 10^6 /sec).

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Ce nombre maximum de réactions catalysées par unité de temps s'appelle le « **turn over number** ». Il est proportionnel à la **vitesse maximale** de l'enzyme.

La **vitesse maximale** n'est obtenue que pour des concentrations élevées en substrat.



Pour des concentrations faibles en substrat, les molécules d'enzyme ne fonctionnent pas au maximum de leur capacité.

A la $\frac{1}{2} V_{max}$, on trouve une concentration de substrat qui correspond à une constante intrinsèque de l'enzyme traduisant son **affinité** pour le substrat.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Cinétique Michaelienne

1879-1960



Née à Port Lambton, Ontario, **Maud Menten** devient la 1^{ère} canadienne à être médecin en 1913, année où elle introduit avec Leonor Michaelis un nouveau concept qui révolutionne les études des réactions biologiques.

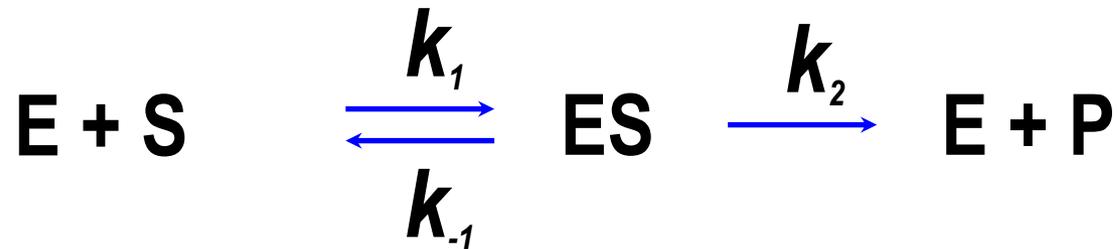


1875-1949

Leonor Michaelis, formé à l'Université de Berlin, ville où il est né, obtient un poste de Professeur de biochimie à Nagoya au Japon, puis en 1926, s'installe à New York au «Rockefeller Institute of Medical Research» jusqu'à sa retraite en 1940.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique



La vitesse d'apparition du produit P (vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme) dépend de k_2 et de la concentration en ES.

$$v_i = k_2 [\text{ES}]$$

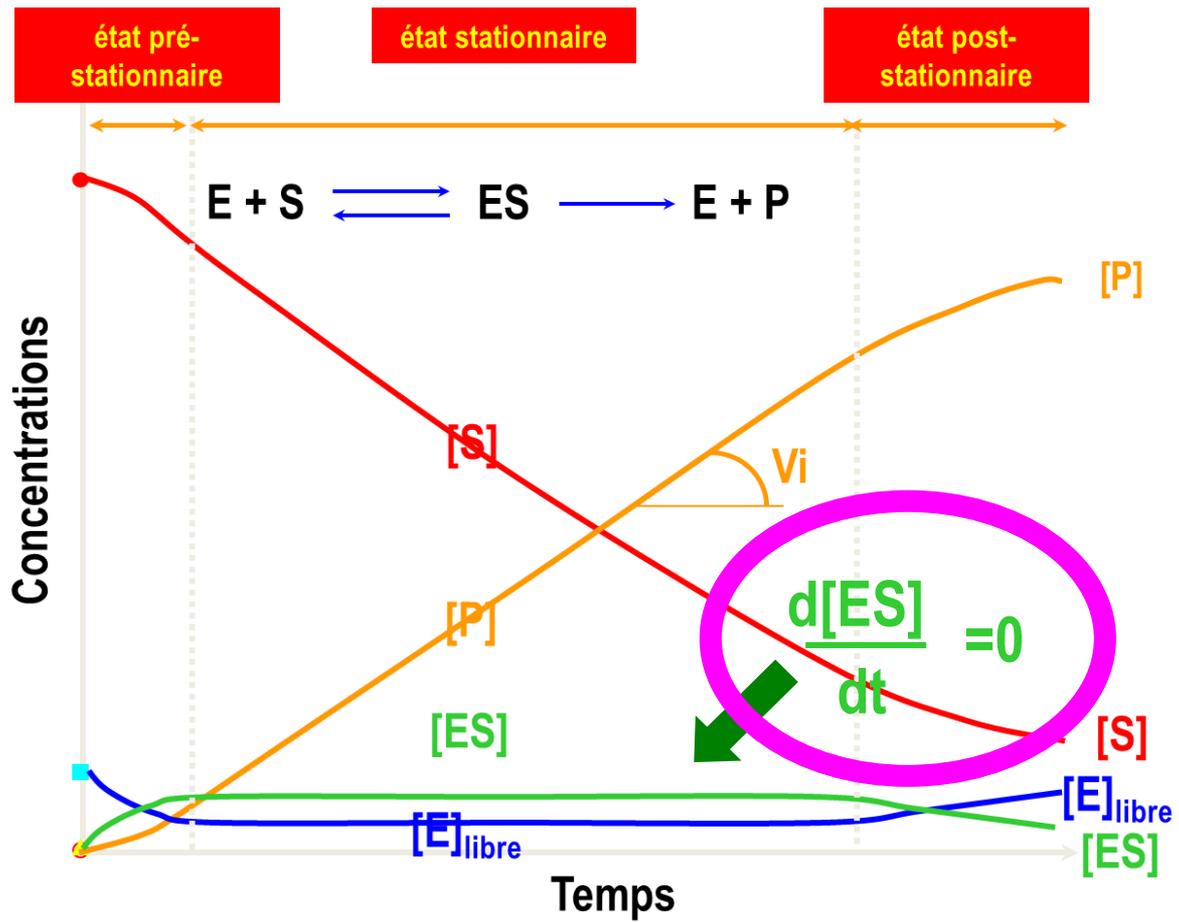
La [ES] dépend de sa vitesse de formation et de sa vitesse de disparition.

$$v_{\text{formation ES}} = k_1 [\text{E}] [\text{S}]$$

$$v_{\text{disparition ES}} = k_{-1} [\text{ES}] + k_2 [\text{ES}] = (k_{-1} + k_2) [\text{ES}]$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique



3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Pendant l'état dit "stationnaire" ou en "vitesse initiale", les vitesses de formation et de disparition de ES sont égales.

$$V_{\text{formation ES}} = V_{\text{disparition ES}}$$

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

Si on réarrange l'expression mathématique :

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

ou

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

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

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

On simplifie l'équation en définissant une nouvelle constante, K_M , appelée constante de Michaelis et Menten :

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Si on réarrange l'expression mathématique :

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_M}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_M}$$

Si l'on regarde le numérateur de cette équation, la $[S]$ est égale (en approximation) à celle de départ ($[S]_0$), puisque la concentration en substrat est très largement supérieure à celle en enzyme.

La concentration en enzyme libre $[E]$ est difficile à appréhender expérimentalement mais on sait qu'elle doit être égale à la concentration totale en enzyme ($[E]_T$) moins la concentration en enzyme lié ($[ES]$).

$$[E] = [E]_T - [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_M}$$

devient

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) [S]}{K_M}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Si on développe

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) [S]}{K_M}$$

cela devient

$$[ES] = \frac{[E]_T [S] - [ES] [S]}{K_M}$$

$$[ES] + \frac{[ES] [S]}{K_M} = \frac{[E]_T [S]}{K_M}$$

$$[ES] \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) = \frac{[E]_T [S]}{K_M} \quad [ES] = [E]_T \frac{\frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Or on sait que : $V_i = k_2 [ES]$

On peut donc écrire : $V_i = k_2 [E]_T \frac{\frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$

On peut simplifier :

$$v_i = k_2 [E]_T \frac{\frac{[S]}{\cancel{K_M}}}{\frac{\cancel{K_M}}{\cancel{K_M}} + \frac{[S]}{\cancel{K_M}}} = k_2 [E]_T \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

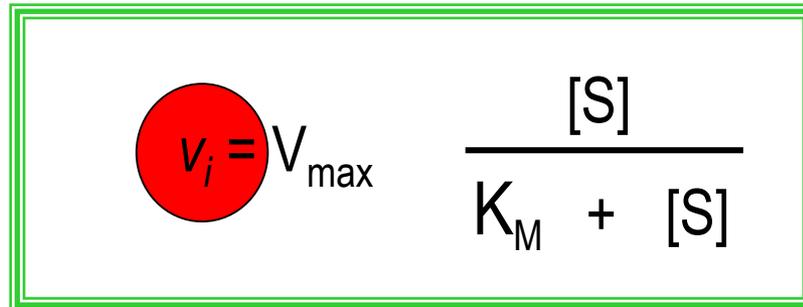
$$v_i = k_2 [E]_T \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Lorsque toutes les molécules d'enzyme sont saturées, $[ES] = [E]_T$ et la vitesse de transformation du substrat en produit est alors maximale :

$$V_{\max} = k_2 [E]_T$$

L'équation de *Michaelis-Menten* devient :

Vitesse initiale



The equation $v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$ is enclosed in a green double-line border. A red circle highlights the $v_i = V_{\max}$ part of the equation.

$[S] = \# K_M$	$v_i = \% V_{\max}$
1	50,00
2	66,67
5	83,33
10	90,91
50	98,04
100	99,01
500	99,80
1000	99,90

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

- Peut-on attribuer à K_M une signification concrète?

Si $v_i = \frac{1}{2} V_{\max}$

~~$\frac{1}{2} V_{\max} = V_{\max}$~~

$$\frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} (K_M + [S]) = [S]$$

$$\frac{1}{2} K_M = [S] - \frac{1}{2} [S]$$

$$\frac{1}{2} K_M = \frac{1}{2} [S]$$

$K_M = [S]$

K_M est la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme fonctionne à la moitié de sa vitesse maximale

- K_M est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme. Plus l'affinité est élevée, et moins il faudra de substrat pour que l'enzyme fonctionne.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

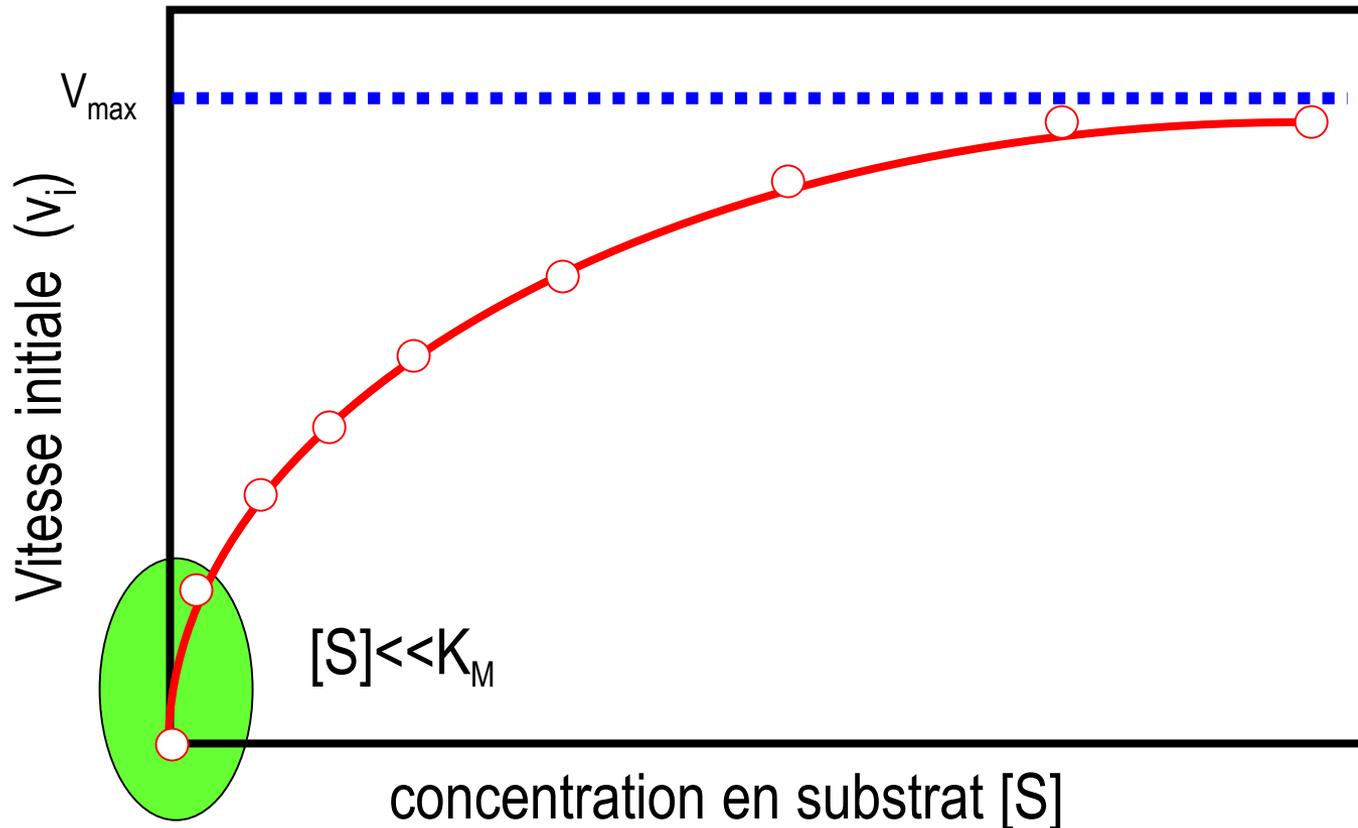
In vivo, la [S] est rarement saturante. Le rapport [S]/K_M est compris entre 0,01 et 1 de sorte qu'au maximum la moitié des sites actifs est occupée par le substrat.

Prenons une condition où K_M >> [S] :

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$



3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

In vivo, la [S] est rarement saturante. Le rapport [S]/K_M est compris entre 0,01 et 1 de sorte qu'au maximum la moitié des sites actifs est occupée par le substrat.

Prenons une condition où K_M >> [S] :

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

devient

$$v_i = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [E]_T [S]$$

$$k_2 = k_{\text{cat}}$$

Dans ces conditions [E]_T ≈ [E]_{libre}

$$v_i = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [E] [S]$$

$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}$ est une constante de vitesse apparente d'ordre 2.

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

k_{cat}/K_M est l'efficacité catalytique de l'enzyme. On l'appelle également k_A .

Lorsqu'un enzyme peut utiliser plusieurs substrats, k_{cat}/K_M permet d'estimer quel sera le substrat le plus utilisé par la protéine.

Plus le substrat est « bon » et plus le rapport k_{cat}/K_M est élevé (forte activité catalytique donc forte k_{cat} et forte affinité donc faible K_M).

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

On peut facilement déterminer K_M et V_{\max} si l'on a les concentrations en substrats utilisées et les vitesses enzymatiques mesurées à ces concentrations.

Pour cela il faut linéariser l'équation de *Michaelis-Menten*.

Il existe plusieurs façon de procéder :

Lineweaver - Burk

Hanes

Eisenthal - Cornish-Bowden

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Lineweaver - Burk

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Si on écrit l'équation en double inverse :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{1}{\frac{[S]}{K_M + [S]}}$$

ou

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]}$$

En réarrangeant on obtient :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\text{Or } V_{\max} = k_2 [E]_T = k_{cat} [E]_T$$

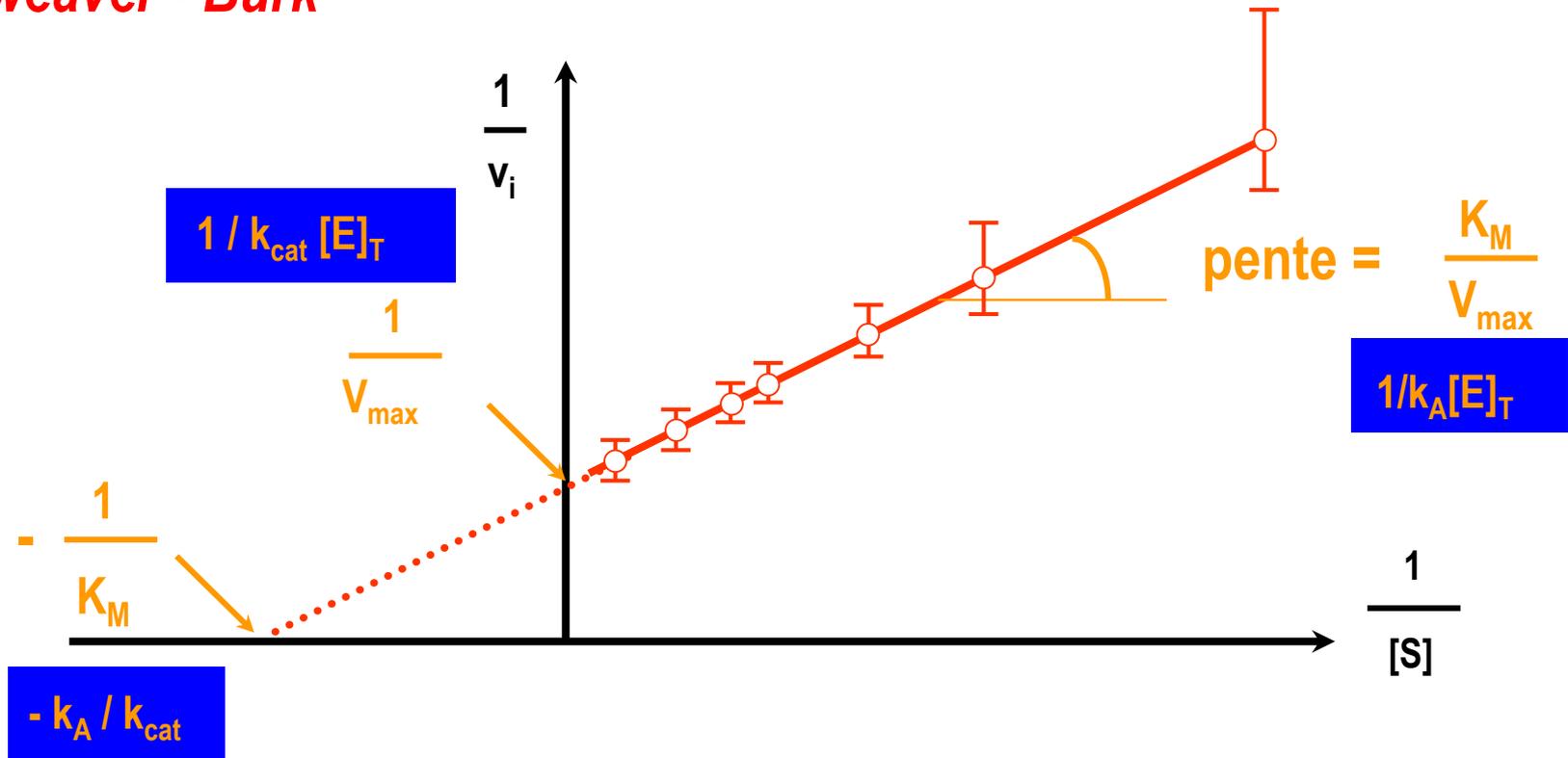
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{k_{cat} [E]_T} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat} [E]_T}$$

$$\text{ou } \frac{[E]_T}{v_i} = \frac{1}{k_A} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat}}$$

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

Lineweaver - Burk



Il s'agit de la représentation **la plus utilisée par les enzymologistes** même s'il vaudrait mieux utiliser d'autres représentations plus adaptées...

3 – La réaction enzymatique

D - introduction à la cinétique enzymatique

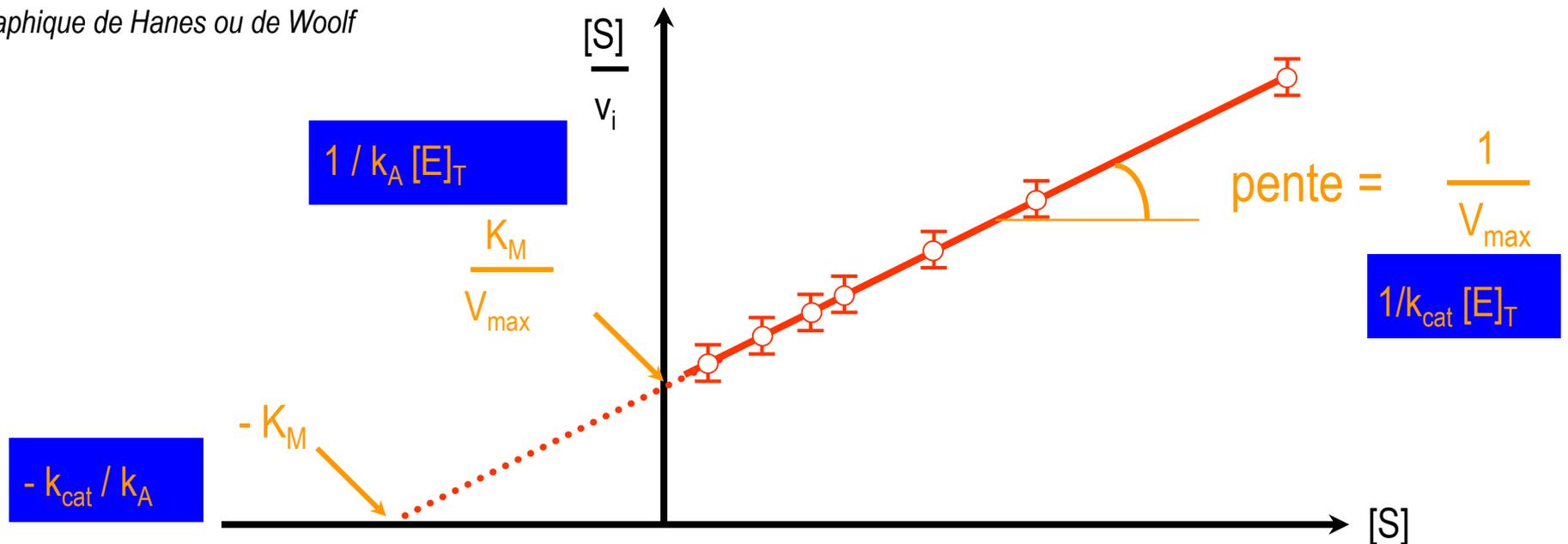
Hanes

Si on multiplie l'égalité de Lineweaver-Burk par [S] :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{devient}$$

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \times [S]$$

Graphique de Hanes ou de Woolf



3 – La réaction enzymatique

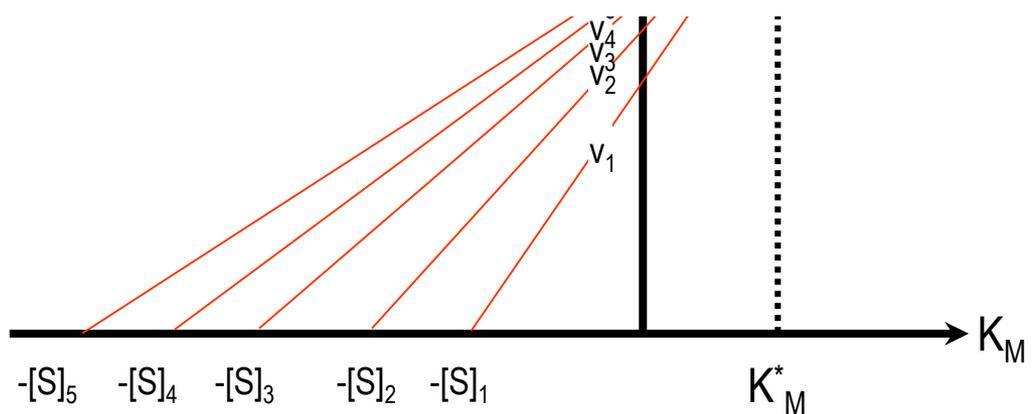
D - introduction à la cinétique enzymatique

Eisenthal - Cornish-Bowden

L'équation de Michaelis-Menten peut se réécrire ainsi :

EXPERIMENTALEMENT

CHOIX 1



TD 

Solution 

3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule

Mesure d'une quantité de produit par technique enzymatique :



Y absorbe la lumière à une longueur d'onde donnée différente de celles auxquelles absorbent S, P et X.

Objectif : quantifier S dans le sérum

Dans une cuve, 10 μ l de sérum sont ajoutés à 980 μ l d'une solution contenant X à 15 mM et du tampon pH 7,5.

10 μ l d'enzyme sont ajoutés. La réaction est totale en 5 minutes.

La D.O. à 340 nm est alors mesurée : 0,180 ($\epsilon_{340 \text{ nm}}^Y = 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Calculer la concentration en S dans le sérum (gamme normale 1 à 4 mM).

3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule

Mesure d'une quantité de produit par technique enzymatique :

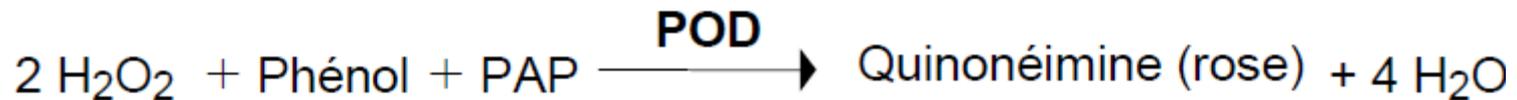
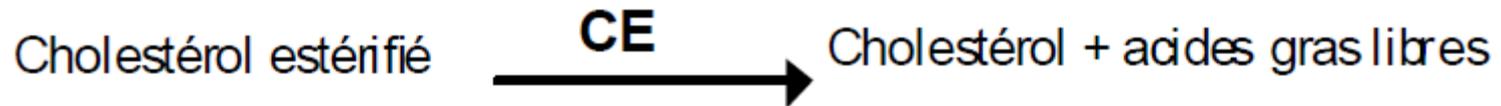


REACTIFS BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SA,
02160, Maizy, France

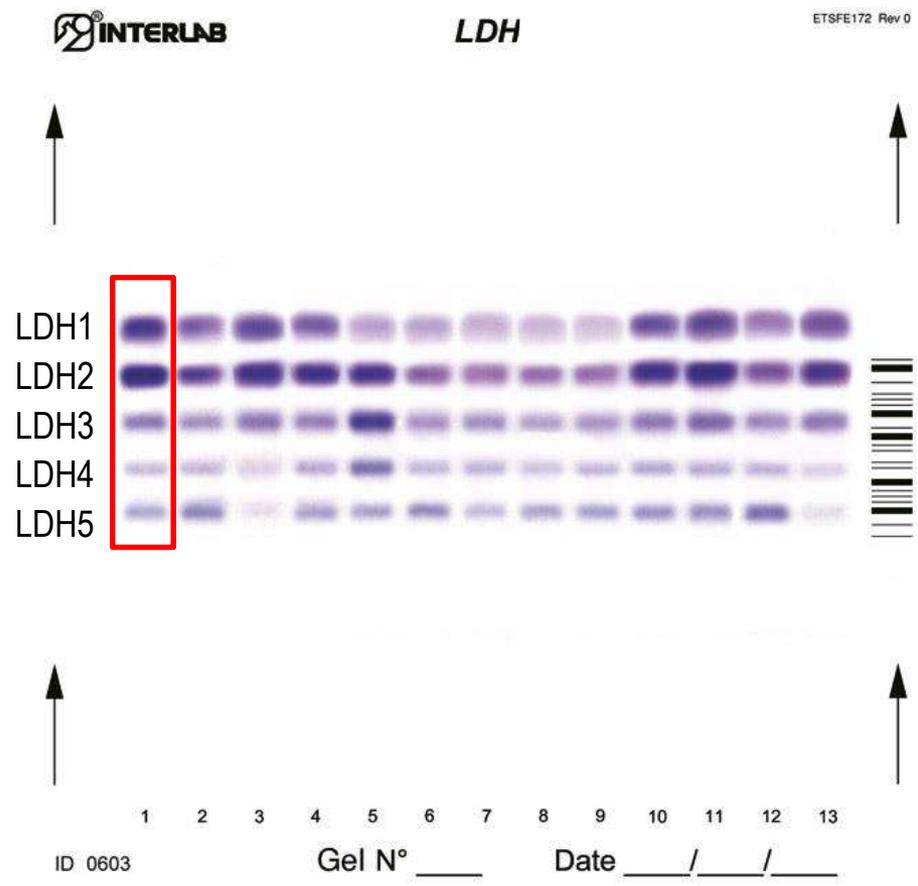
CHOLESTEROL Méthode **CHOD-PAP**

Réactif pour le dosage quantitatif
du cholestérol total dans le plasma ou le sérum humains

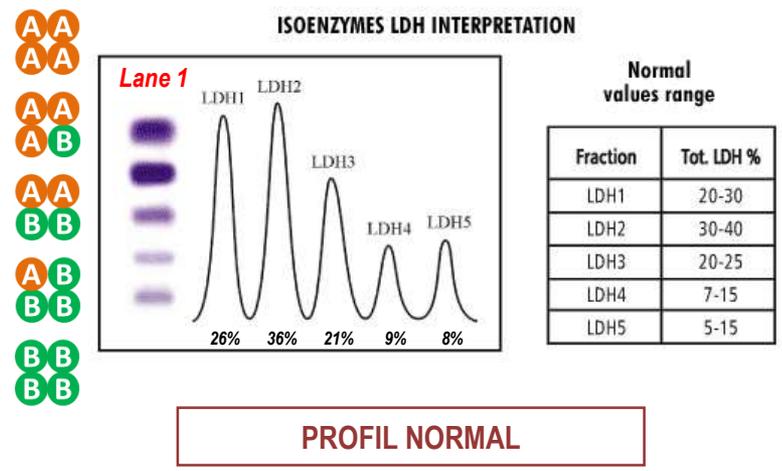


3 – La réaction enzymatique

E – Mesures enzymatiques : quantification d'une biomolécule



La LDH sérique est un marqueur d'AVC et d'infarctus.



Effecteurs réversibles de la réaction enzymatique

3.1 Effecteur

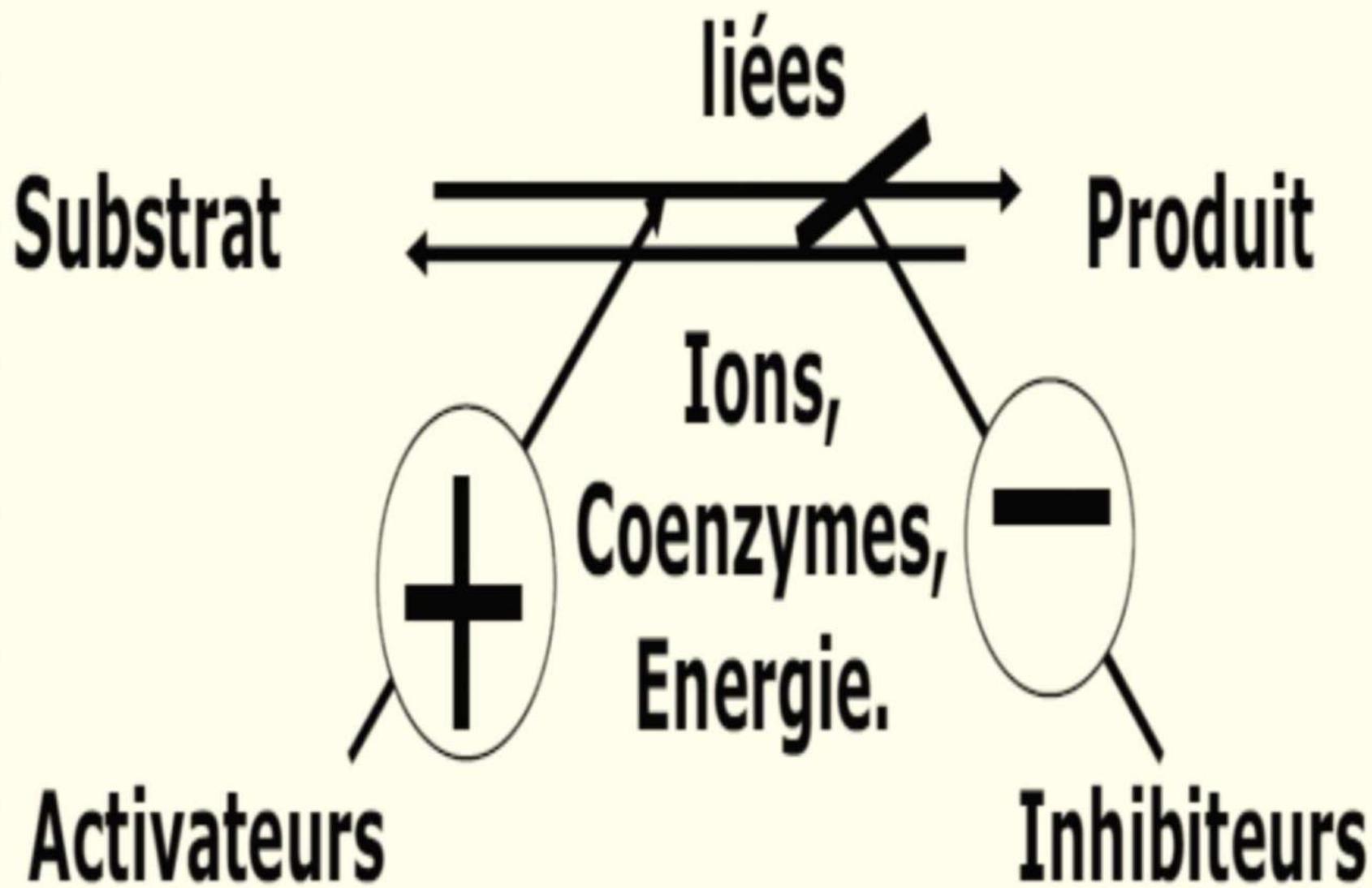
Corps chimique (molécules ou atomes, minéraux ou organiques) qui par sa liaison avec l'enzyme modifie la vitesse de la réaction enzymatique (sans être un cofacteur indispensable) :

- * Soit en l'accélération : Activateur
- * Soit en la ralentissant : Inhibiteur

Parmi ces effecteurs on distingue trois groupes :

- Molécules organiques inhibitrices ou activatrices.
- Ions métalliques
- pH

Enzyme, Cofacteurs et coenzymes



Les inhibitions des réactions enzymatiques

1. Définition et caractéristiques générales des inhibiteurs
2. Inhibition compétitive (fixation exclusive)
3. Inhibition non compétitive (fixation non exclusive)
4. Inhibition incompétitive (fixation non exclusive)
5. Tableau résumé des modifications des paramètres cinétiques en présence de l'un des trois inhibiteurs précédents
6. Inactivation : inhibition Irréversible
7. Inhibition par excès de substrat
8. Exemples de mécanismes plus complexes

1. Définition et caractéristiques générales des inhibiteurs

- **Toute molécule qui modifie la vitesse d'une réaction enzymatique est appelée un effecteur :**
 - les effecteurs qui augmentent l'activité enzymatique sont des activateurs
 - à l'inverse, ceux qui la diminuent sont des inhibiteurs
 - certaines molécules peuvent, selon les conditions, se comporter comme un activateur ou un inhibiteur.

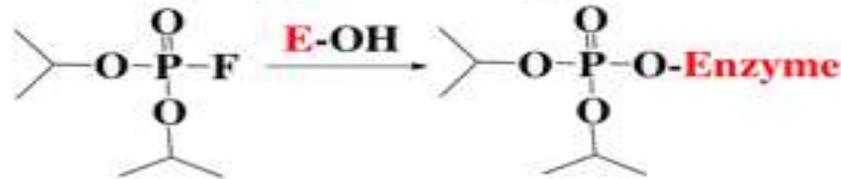
L'étude de l'effet d'inhibiteurs permet :

- d'affiner le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique
- de mieux connaître la spécificité d'une enzyme
- d'obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif
 - En effet, certains inhibiteurs s'associent de manière réversible à l'enzyme en interagissant de manière non covalente.
 - D'autres se fixent de manière irréversible et sont souvent utilisés pour déterminer les groupes actifs du site catalytique.

Mécanismes d'inhibition des protéases à sérine par différents composés qui forment un intermédiaire tétraédrique.

Mécanismes d'inhibition qui forment un intermédiaire tétraédrique

DiisopropylFluoroPhosphate (DFP)



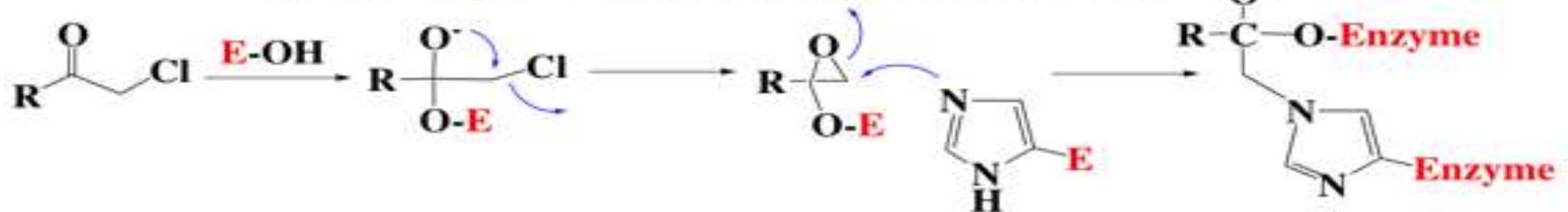
E-OH :
sérine de
l'enzyme

PhenylMethaneSulfonylFluoride (PMSF)

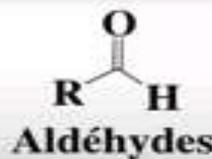


Chlorométhyl cétones

exemple : tosyl-L-Phe chlorométhyl cétone (TPCK)



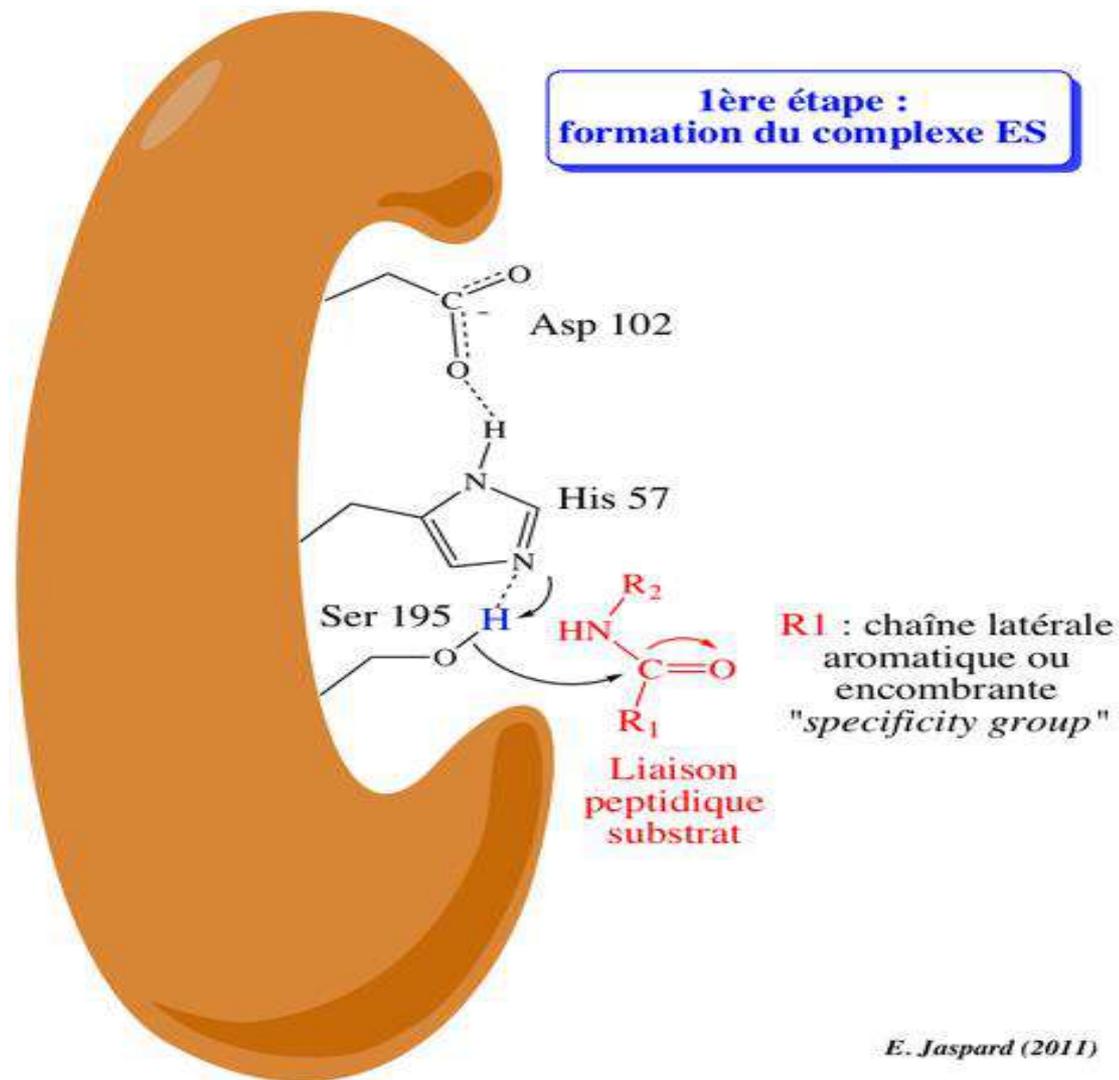
Autres
inhibiteurs



E. Jaspard (2013)

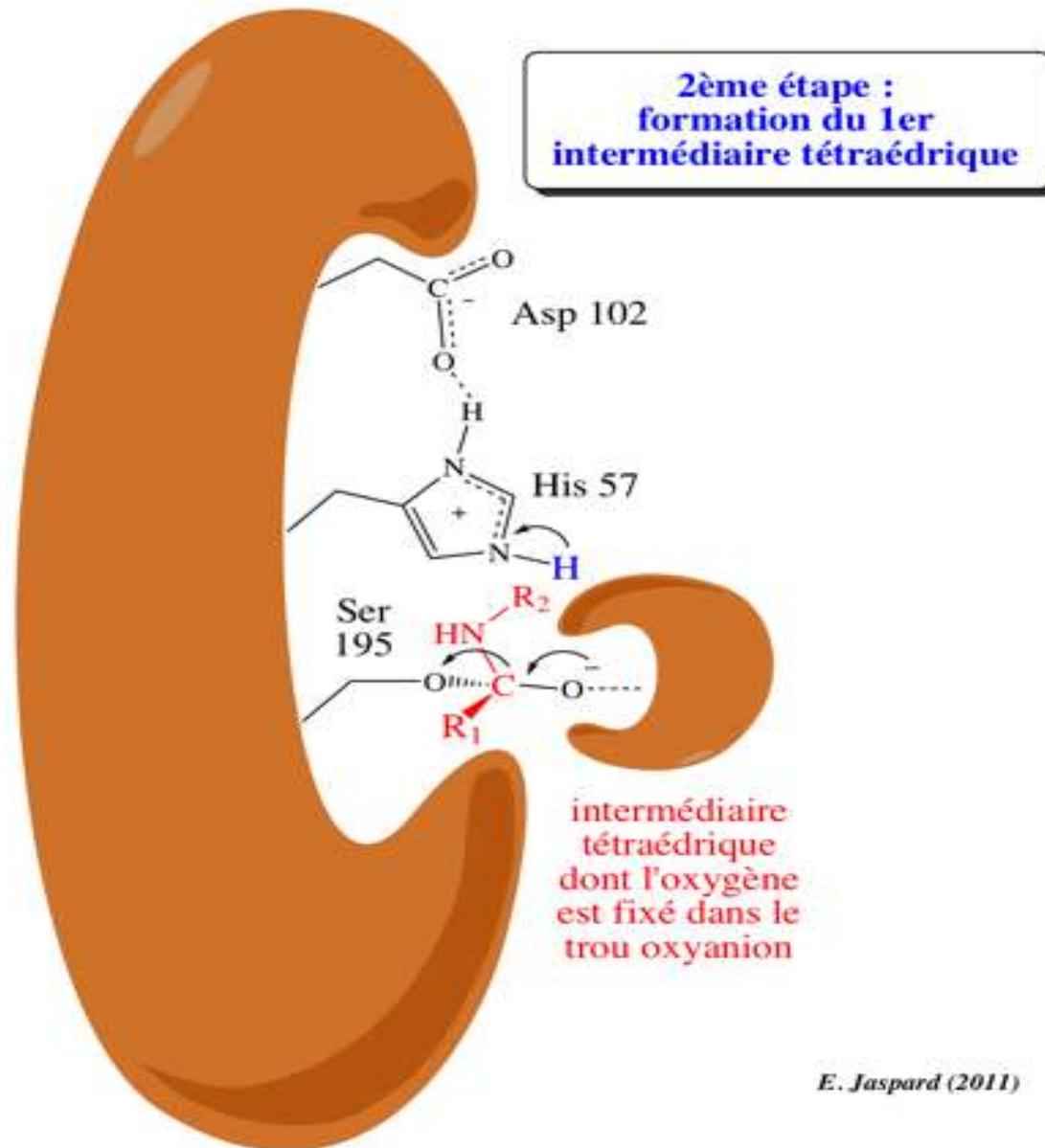
Ces composés ont permis d'identifier la sérine 195 du site actif.

1^{ère} étape : formation du complexe enzyme-substrat (ES)

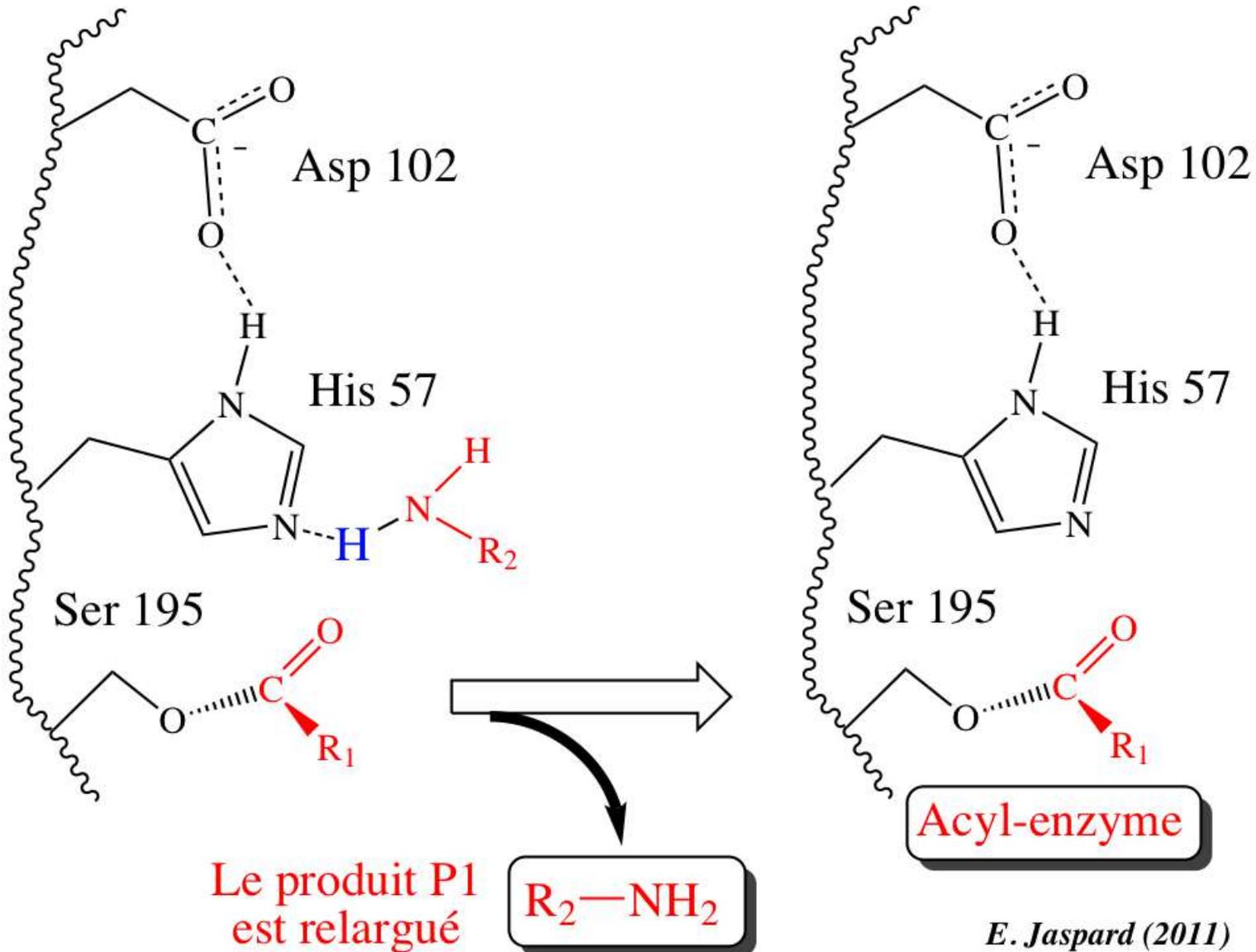


La protéase fixe le substrat (protéine ou peptide) dont elle hydrolyse la liaison peptidique au niveau d'acides aminés spécifiques de la protéase considérée.

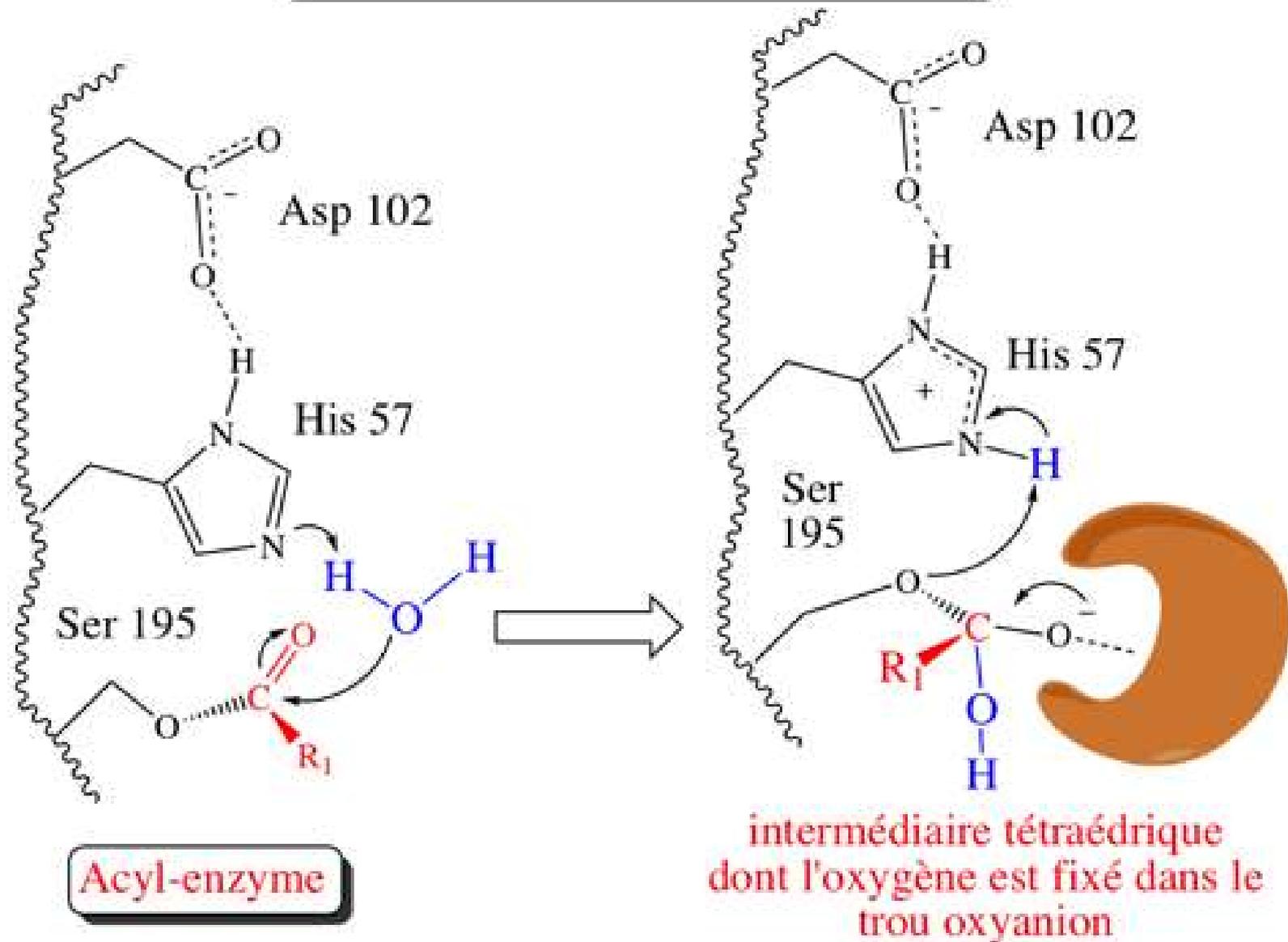
2^{ème} étape : acylation / formation du premier intermédiaire tétraédrique



3ème étape : formation de l'intermédiaire acyl-enzyme et libération du premier produit de la réaction

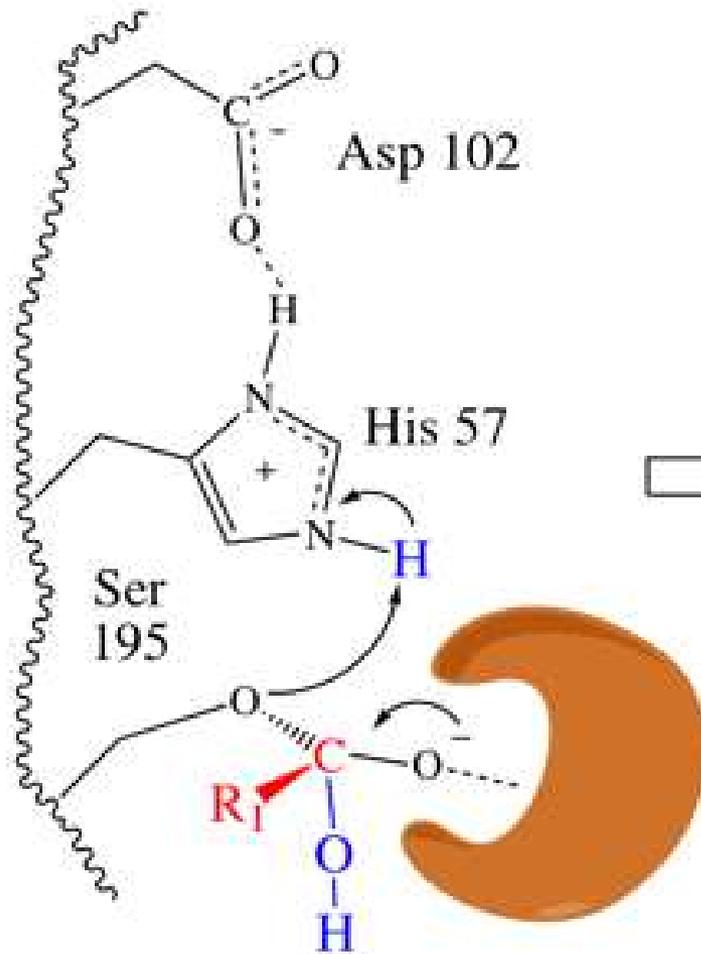


4ème étape : formation du second intermédiaire tétraédrique

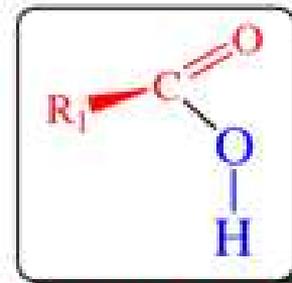
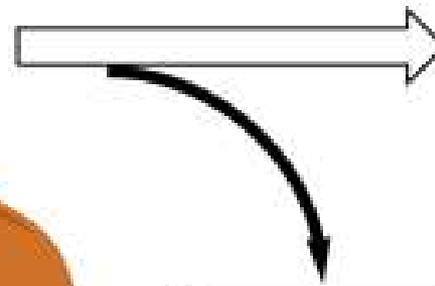


5ème et dernière étape : formation du second produit de la réaction

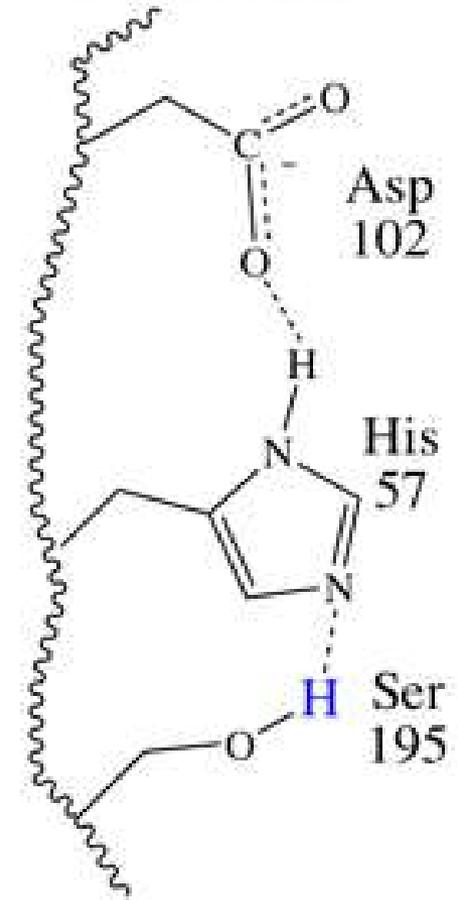
La triade catalytique revient à son état initial



Deuxième intermédiaire tétraédrique



Le produit P2 est relargué



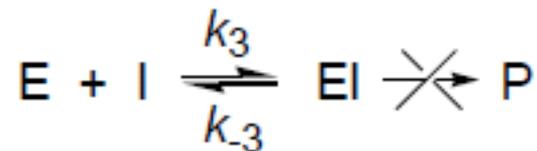
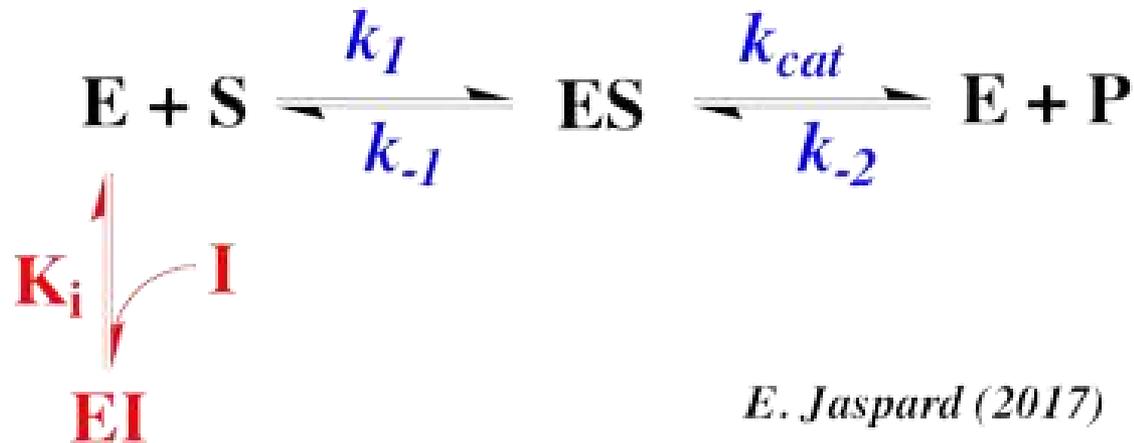
Selon le type d'inhibiteur, l'enzyme peut fixer :

- le substrat ou l'inhibiteur : c'est la fixation exclusive avec formation de complexes binaires ES ou EI
- le substrat et l'inhibiteur : c'est la fixation non-exclusive avec formation de complexes ternaires (ESI). Si ce complexe ternaire reste encore actif (moins que le complexe ES), l'inhibition est dite partielle et s'il est totalement inactif, l'inhibition est dite totale.

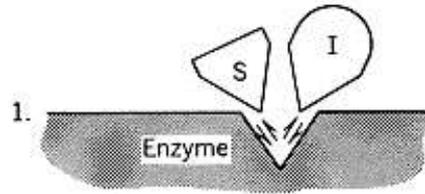
2. Inhibition compétitive (fixation exclusive)

C'est un mécanisme où la fixation de l'inhibiteur empêche celle du substrat (et réciproquement) : **Le mécanisme réactionnel :**

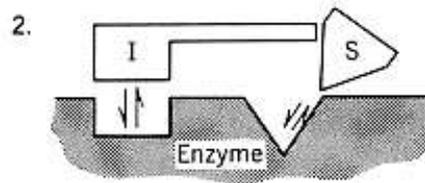
Inhibition compétitive



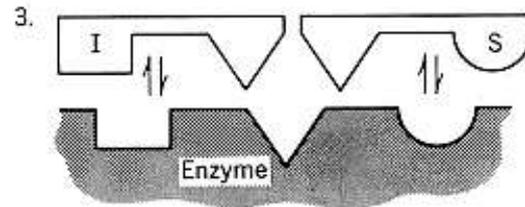
Différents modèles de l'inhibition compétitive (fixation réversible exclusive)



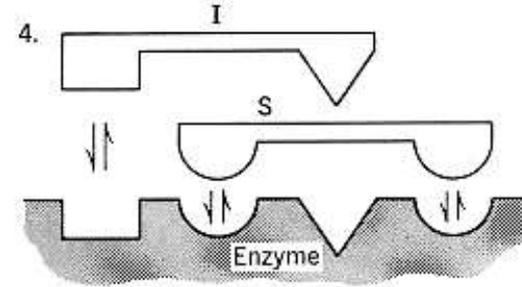
analogie de structure.



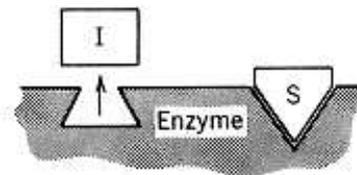
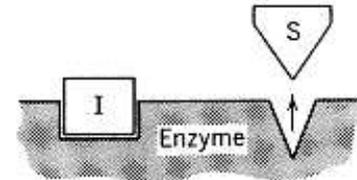
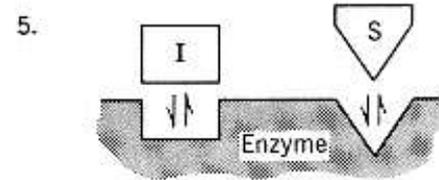
encombrement stérique



groupe en commun



se recouvrent

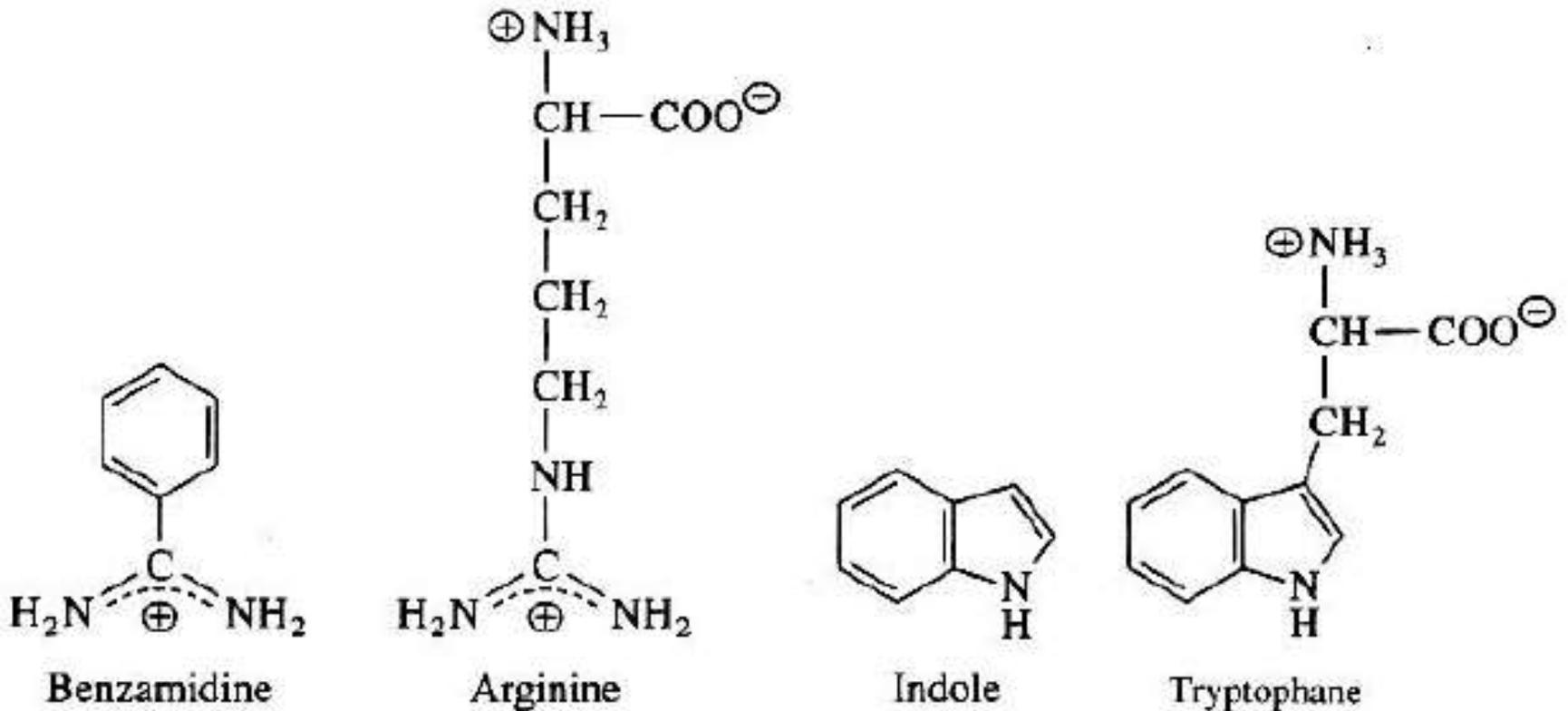


changement de conformation 5

Illustrations des inhibiteurs compétitifs

Source : "Enzyme Kinetics" I. Segel (1975), Ed. J. Wiley & Sons, Inc.

Exemples d'inhibiteurs compétitifs de protéase à sérine (EC 3.4.21.)



analogues structuraux de la chaîne latérale de l'arginine et du tryptophane

❖ L'inhibiteur bloque le site actif de l'enzyme, empêchant la liaison du substrat. Son efficacité est décrite par la constante d'inhibition, K_i (constante de dissociation du complexe E-I) = k_{-3}/k_3 .

❖ Pour une simple réaction à un substrat, l'effet de l'inhibiteur compétitif sur la vitesse initiale de la réaction est donné par:

$$V_o = \frac{V_{\max}}{1 + (K_m/[S]) \times (1 + [I]/K_i)}$$

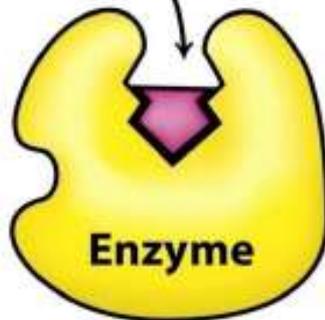
❖ L'inhibiteur peut être déplacé à des concentrations élevées du substrat.

❖ Les inhibiteurs compétitifs n'ont pas d'effet sur le V_{\max} de l'enzyme, mais changent le K_m . Le K_m augmente par un facteur de $(1 + [I]K_i)$.

l'inhibition compétitive peut-être "levée" à concentration saturante en substrat

Inhibition compétitive

Competitive inhibitor



Pas de complexe ESI

I ressemble à S et l'empêche de se fixer

Diminution du nombre de ES

Levée par augmentation de S

Idem augmentaion de K_m , V_{max} inchangée

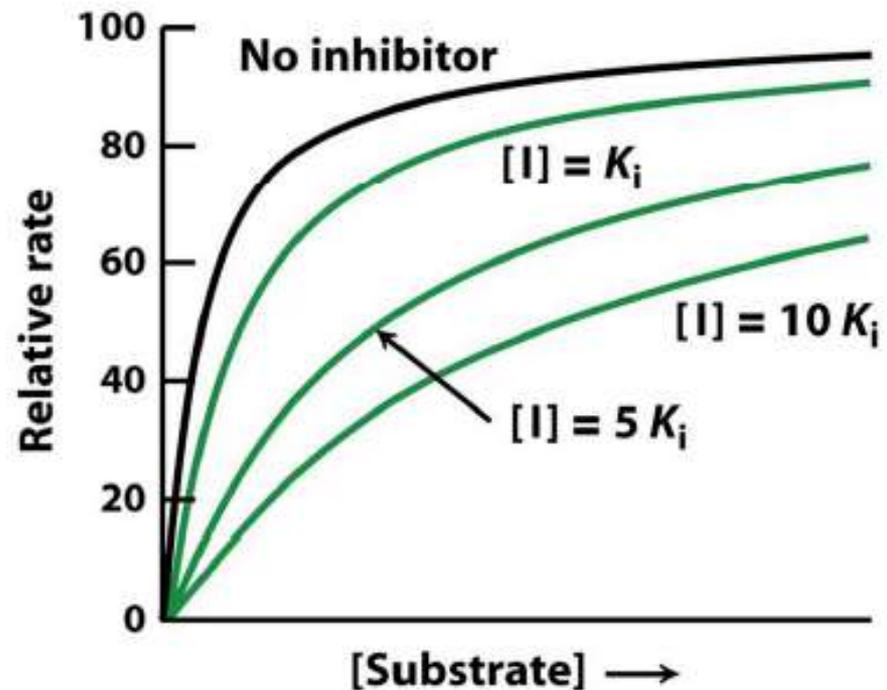
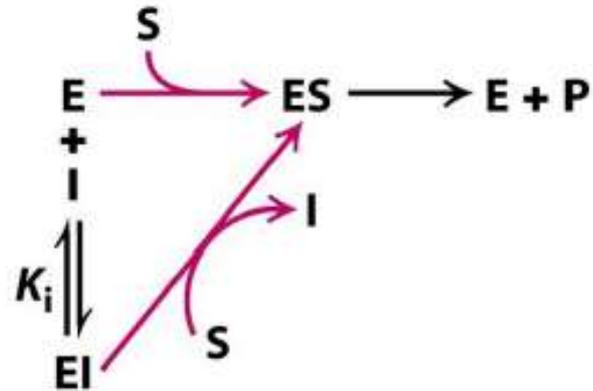
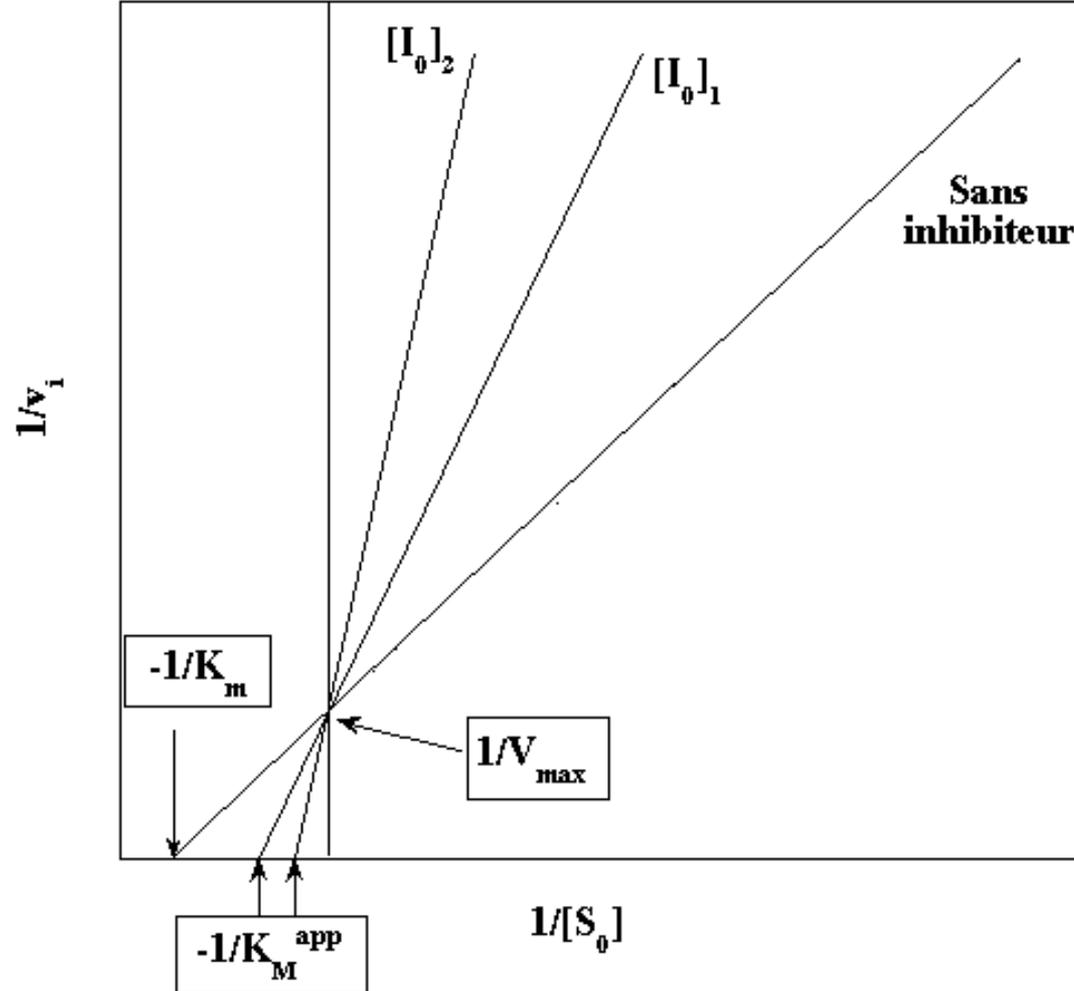


Figure 8-17
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

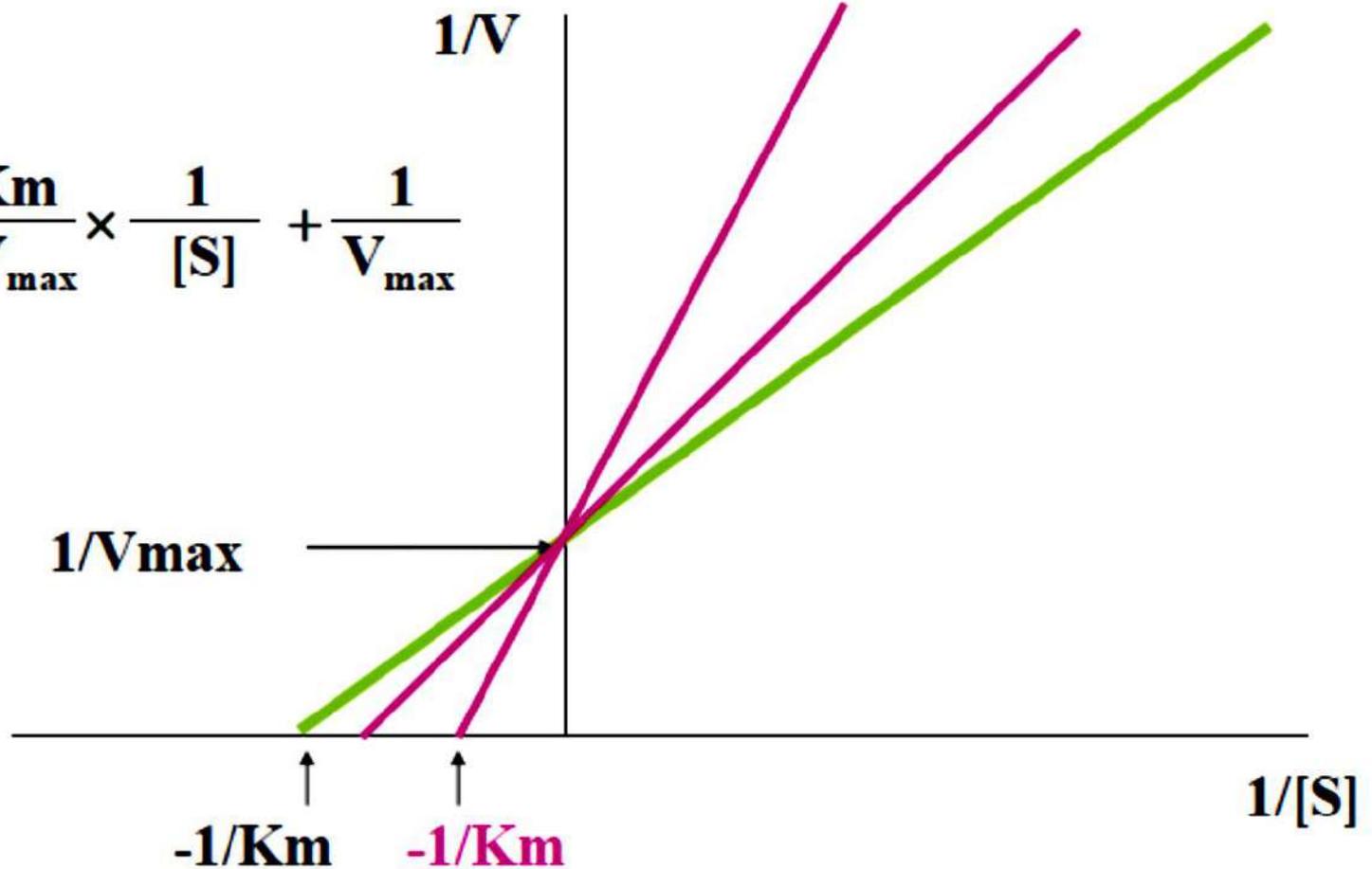
Représentation de Lineweaver - Burk ($1/v_i = f(1/[S_0])$) dans le cas d'une inhibition compétitive

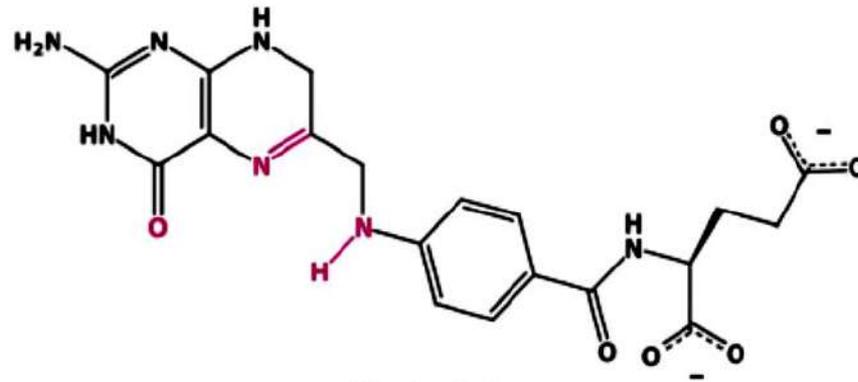


- Le point de concourance de toutes les droites sur l'axe des ordonnées correspond à $1/V_{max}$.
- La vitesse maximale n'est pas modifiée.
- Pour des concentrations croissantes en inhibiteur ($[I_0]_1 < [I_0]_2$), l'intersection sur l'axe des abscisses donne une valeur de $-1/K_M^{app}$ qui augmente, donc K_M^{app} augmente.

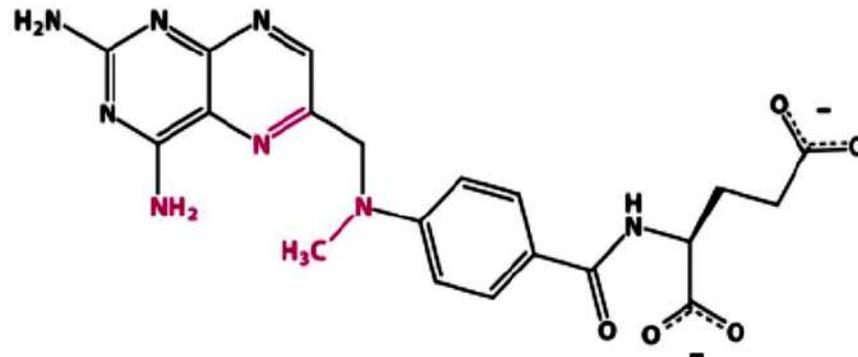
Représentation graphique en double inverse : inhibiteur compétitif

$$1/V = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$





Dihydrofolate



Methotrexate

Figure 8-16
 Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Methotrexate : 1000* plus de fixation que le DHF sur la DHF reductase
 (métabolisme des purines et pyrimidines) : chimiothérapie

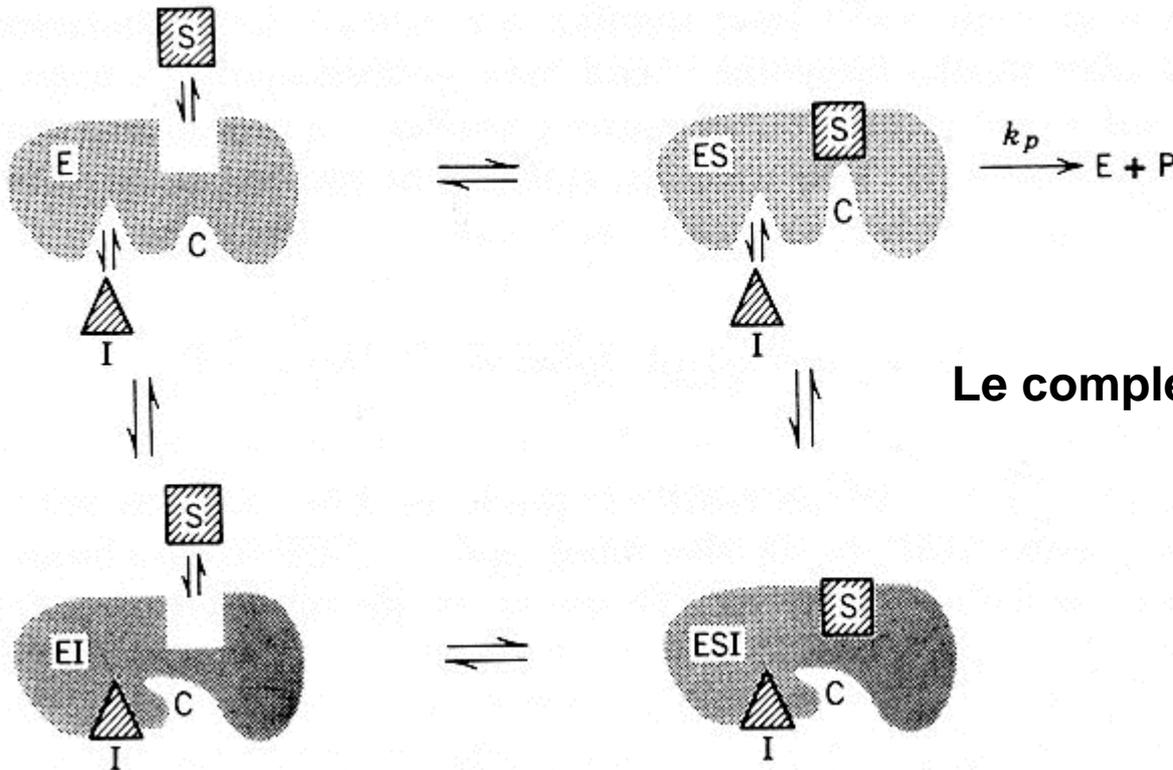
Inhibition non compétitive (fixation non exclusive)

- Un inhibiteur non compétitif classique n'a aucune influence sur la fixation du substrat (et réciproquement) : les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts.
- l'inhibiteur se fixe à l'enzyme libre E et au complexe ES ; de même, le substrat se fixe à l'enzyme libre E et au complexe EI
- Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec le substrat

Modèles de l'inhibition non compétitive (fixation réversible, non exclusive)

Modèle "classique"

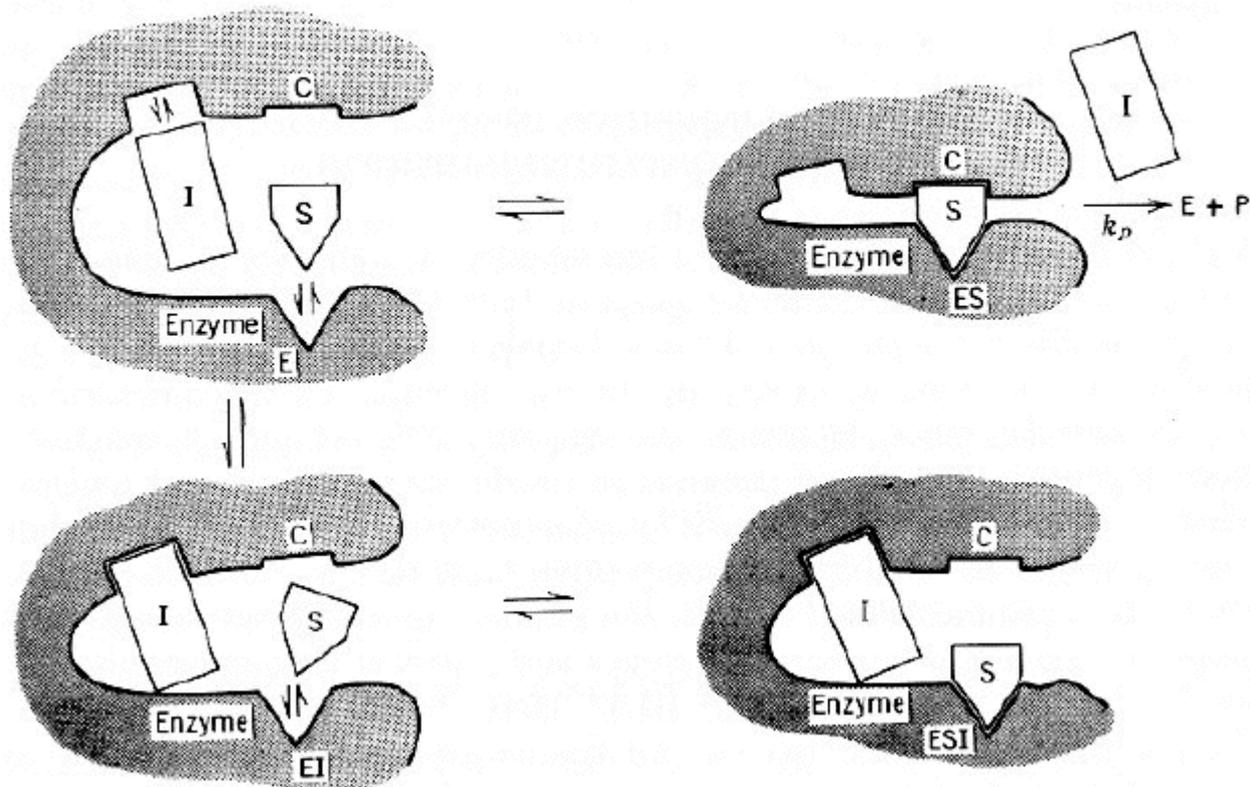
- La fixation de l'inhibiteur **ne modifie pas** la manière dont se fixe le substrat mais elle **empêche** les ajustements conformationnels du site actif qui devraient avoir lieu pour qu'il y ait catalyse.



Le complexe ternaire ESI est **inactif**

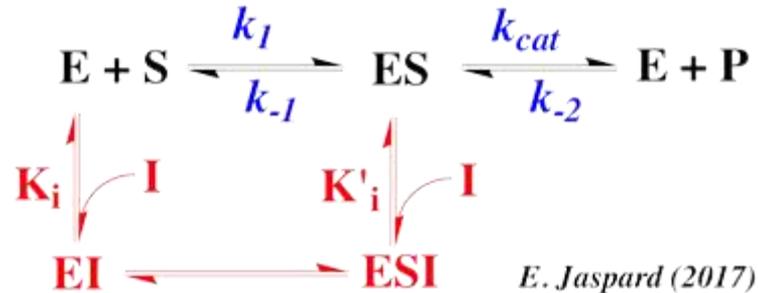
Autre modèle

- Il suggère qu'il n'y a pas de transconformation possible entre ES et ESI, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'équilibre : $ES + I \not\rightleftharpoons ESI$.
- Cependant, l'effet de l'inhibiteur est le même que dans le modèle ci-dessus parce que les 4 formes de l'enzyme (E, EI, ES et ESI) sont en équilibre ($ESI \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons E \rightleftharpoons ES$).



Le mécanisme réactionnel :

Inhibition non compétitive



- ❖ L'inhibiteur se lie à l'enzyme à un site autre que le site actif, causant ainsi un changement réversible dans la structure tertiaire de l'enzyme qui interfère la vitesse de conversion du substrat en produit.
- ❖ L'inhibiteur peut interagir avec l'enzyme libre ou avec le complexe E·S.
- ❖ Dans ce type d'inhibition, la quantité d'enzyme active semble diminuer lorsque [I] augmente; V_{max} de la réaction diminue:

$$V_o = \frac{V_{max}}{(1 + [I]/K_i) \times (1 + K_m/[S])} \quad \text{où } V_{max,app} = V_{max}/\{1 + [I]/K_i\}$$

Inhibition non compétitive

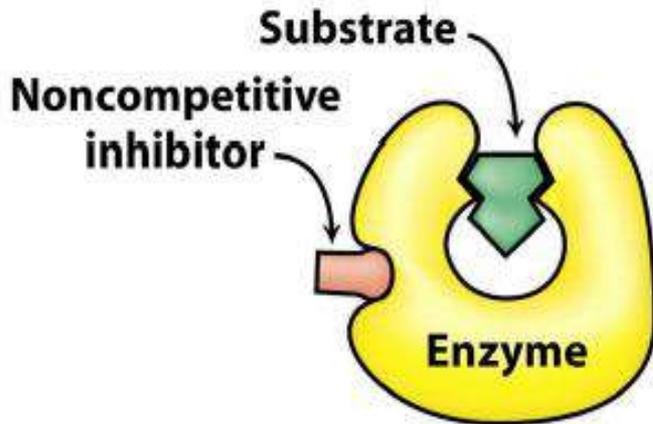


Figure 8-14C
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Comme si on a une baisse de E fonctionnel

Donc baisse de V_{max} mais K_m idem

Non levée par augmentation de S

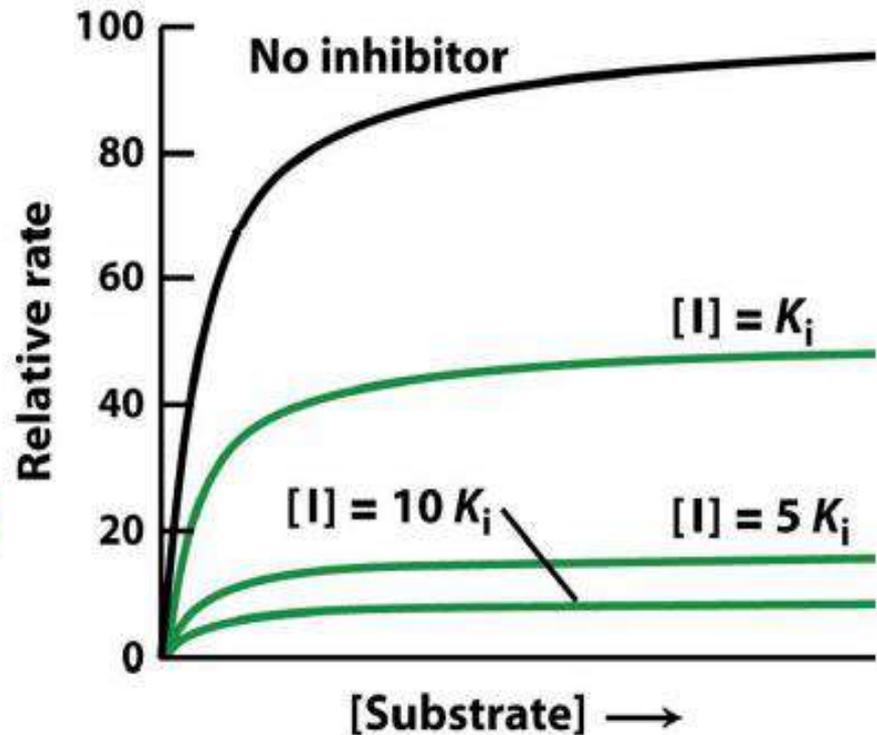
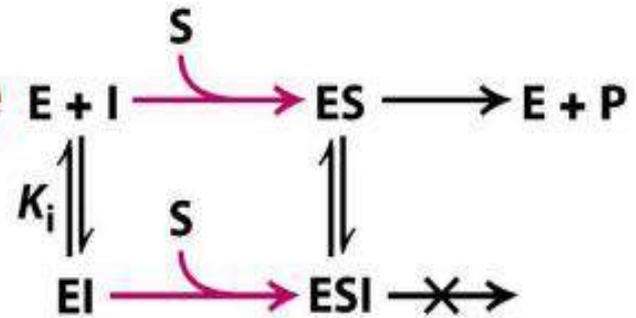
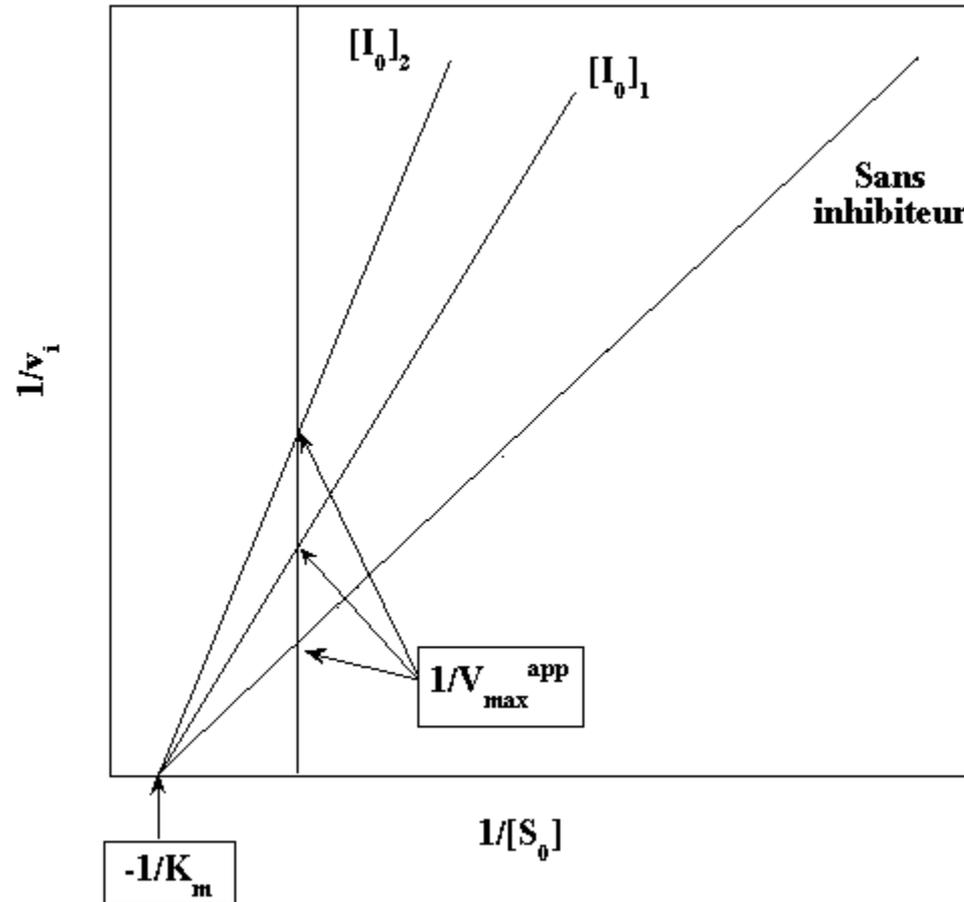


Figure 8-19
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Représentation de Lineweaver - Burk ($1/v_i = f(1/[S_0])$) dans le cas d'une inhibition non compétitive pure



Rappel : inhibition non compétitive pure $\Rightarrow K_i = K'_i$

- Pour des concentrations croissantes en inhibiteur ($[I_0]_1 < [I_0]_2$), l'intersection sur l'axe des ordonnées donne une valeur de $1/V_{\max}^{\text{app}}$ qui augmente, donc V_{\max}^{app} diminue.
- K_M n'est pas modifiée.

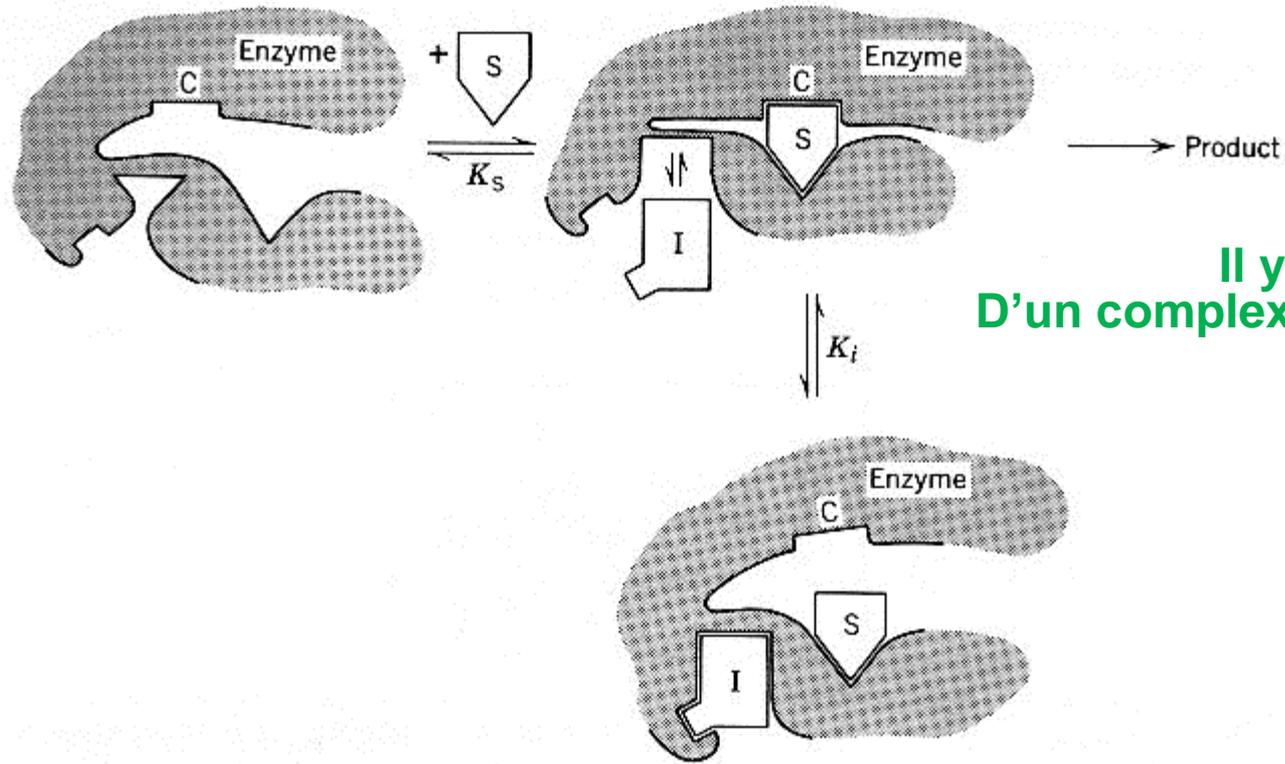
Inhibition non compétitive "pure" et "mixte"

- on appelle "pure", l'inhibition non compétitive où l'inhibiteur se fixe avec la même affinité à l'enzyme libre E et au complexe enzyme - substrat ES ($K_i = K'_i$) ;
- on appelle "mixte", l'inhibition non compétitive où l'inhibiteur se fixe avec des affinités différentes à E et à ES (K_i différent K'_i).
- L'inhibition non compétitive est rare et on en trouve des exemples essentiellement dans le cas des enzymes à régulation allostérique.

Inhibition incompétitive



La fixation du substrat S à l'enzyme (au niveau du site C) induit un changement de conformation de celle-ci qui forme (ou révèle) le site de fixation de l'inhibiteur I.



Il y a formation
 D'un complexe ternaire ESI est inactif.

Inhibiteur incompétitif

- ❖ Les inhibiteurs incompétitifs se lient au complexe E-S, réduisant ainsi la vitesse de formation du produit. Il y a une diminution de K_m et de V_{max} de la réaction enzymatique.
- ❖ Une approximation de ce comportement est donnée par la relation:

$$V_o = \frac{V_{max}}{(K_m/[S]) + ([I]/K_i) + 1}$$

- ❖ Le modèle prédit un changement équivalent de K_m et de V_{max} , résultant en des droites de pentes identiques dans le graphique de Lineweaver-Burk.

Ce type d'inhibition est essentiellement observé pour des réactions impliquant plusieurs substrats.

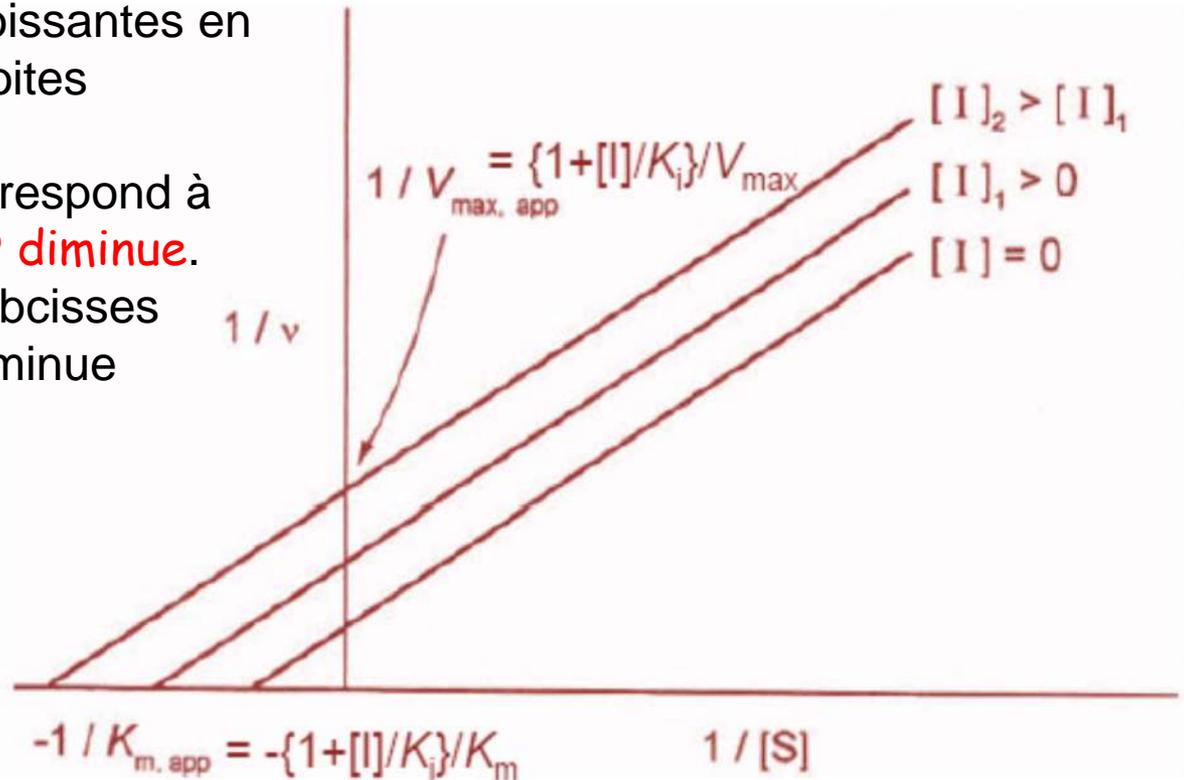
En présence de ce type d'inhibiteur :

- Les deux paramètres (V_M et K_M) sont modifiés par le même facteur. En effet, ce type d'inhibiteur favorise la formation du complexe [enzyme-substrat] qui lui-même est consommé pour former le complexe ESI.
- L'équilibre : $E+S \rightleftharpoons ES$ est donc déplacé en faveur de ES. Cela signifie que, pour un même degré de saturation de l'enzyme il faut une concentration plus faible en substrat (K_M diminue).
- La concentration du complexe [ES] est moindre (une partie se trouve sous forme ESI), donc V_M diminue.
- Cette inhibition ne peut être "levée" par un excès de substrat puisque plus il y a de substrat, plus il y a formation de complexe ES et plus l'équilibre de fixation de l'inhibiteur est déplacé en faveur du complexe ternaire ESI.

Représentation de Lineweaver - Burk ($1/v_i = f(1/[S_0])$) cas d'une inhibition incompétitive

- Pour des concentrations croissantes en inhibiteur ($[I_0]_1 < [I_0]_2$), les droites sont **parallèles**.
- sur l'axe des ordonnées correspond à $1/V_M^{\text{app}}$ qui augmente : V_M^{app} **diminue**.
- L'intersection sur l'axe des abscisses correspond à $-1/K_M^{\text{app}}$ qui diminue : K_M^{app} **diminue**.

Graphique Lineweaver-Burk pour un inhibiteur incompétitif



Inhibition Irréversible exemple 1 : aspirine

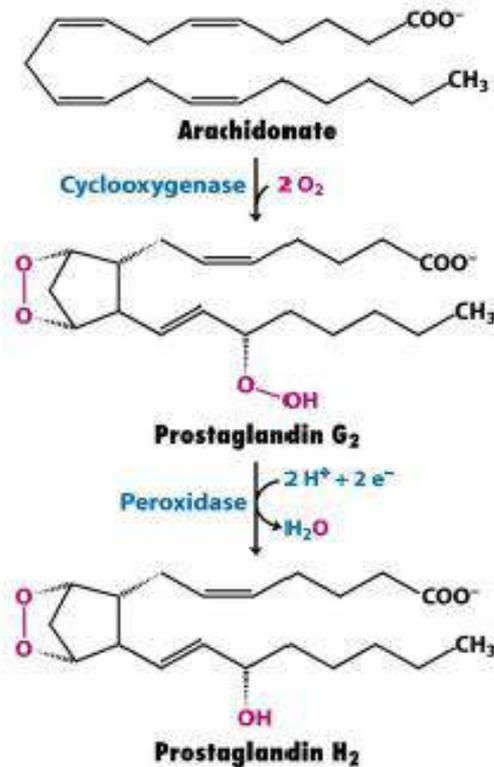


Figure 12-22
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

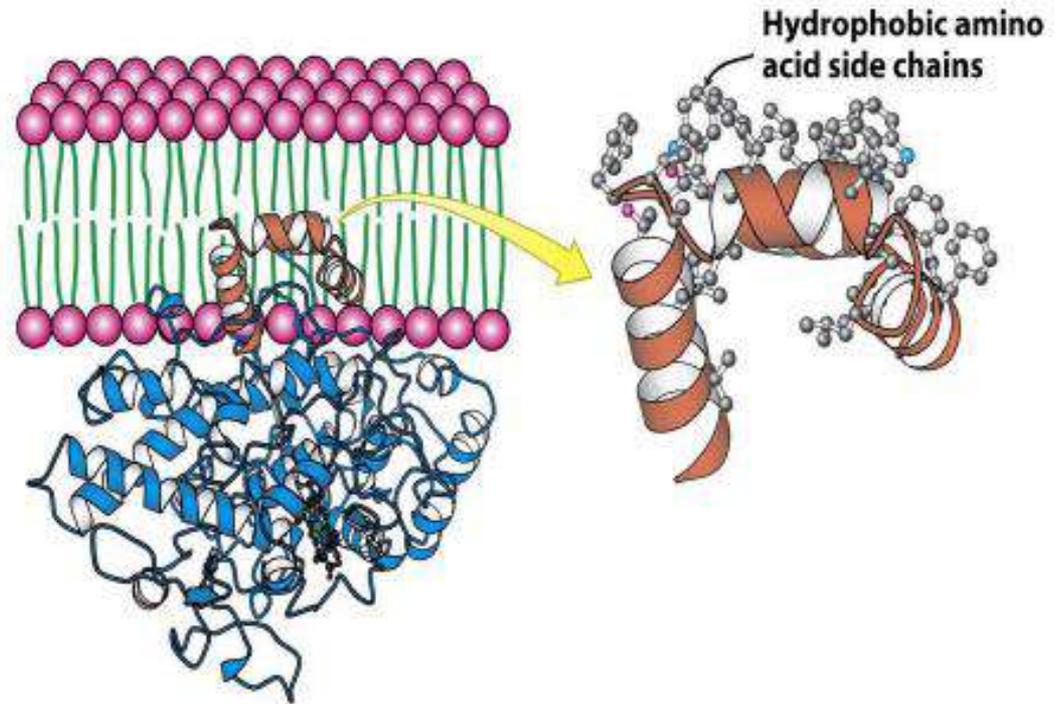


Figure 12-23
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

$V_M \cdot \frac{[S_0]}{K_M + [S_0]}$

Tableau résumé des modifications des paramètres cinétiques en présence de l'un des trois inhibiteurs précédents

Type d'inhibition	Vitesse maximale	Constante de Michaelis	Constante d'inhibition	Coordonnées des droites de Lineweaver et Burk		
				Ordonnée à l'origine	Abscisse à l'origine	Pente
Aucun	V_m	K_m		$\frac{1}{V_m}$	$-\frac{1}{K_m}$	$\frac{K_m}{V_m}$
Compétitive	V_m	$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$	$K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{K'_m}{K_m} - 1 \right)}$	$\frac{1}{V_m}$	$-\frac{1}{K'_m} = -\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	$\frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$
Non compétitive	$V'_m = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	K_m	$K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{V_m}{V'_m} - 1 \right)}$	$\frac{1}{V'_m} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}{V_m}$	$-\frac{1}{K_m}$	$\frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$
Incompétitive	$V'_m = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	$K'_m = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	$K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{K_m}{K'_m} - 1 \right)}$ $K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{V_m}{V'_m} - 1 \right)}$	$\frac{1}{V'_m} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$	$-\frac{1}{K'_m} = -\frac{1}{K_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$	$\frac{K_m}{V_m}$

V_M^{app} et K_M^{app} ("**app**" pour **apparent**) sont les valeurs de V_M et K_M , respectivement, mesurées en présence d'un inhibiteur à une concentration $[I_0]$.

Tableau résumé des modifications des paramètres cinétiques en présence de l'un des trois inhibiteurs précédents

Type d'inhibition	Vitesse maximale	Constante de Michaelis	Constante d'inhibition	Coordonnées des droites de Lineweaver et Burk		
				Ordonnée à l'origine	Abscisse à l'origine	Pente
Aucun	V_m	K_m		$\frac{1}{V_m}$	$-\frac{1}{K_m}$	$\frac{K_m}{V_m}$
Compétitive	V_m	$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$	$K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{K'_m}{V_m} - 1 \right)}$	$\frac{1}{V_m}$	$-\frac{1}{K'_m} = -\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	$\frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$
Non compétitive	$V'_m = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	K_m	$K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{V_m}{V'_m} - 1 \right)}$	$\frac{1}{V'_m} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}{V_m}$	$-\frac{1}{K_m}$	$\frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$
Incompétitive	$V'_m = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	$K'_m = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$	$K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{K_m}{K'_m} - 1 \right)}$ $K_I = \frac{[I]}{\left(\frac{V_m}{V'_m} - 1 \right)}$	$\frac{1}{V'_m} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$	$-\frac{1}{K'_m} = -\frac{1}{K_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$	$\frac{K_m}{V_m}$

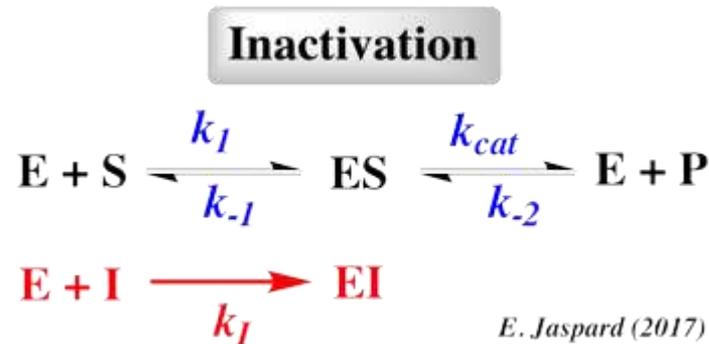
V_M^{app} et K_M^{app} ("**app**" pour **apparent**) sont les valeurs de V_M et K_M , respectivement, mesurées en présence d'un inhibiteur à une concentration $[I_0]$.

Tableau comparatif des différentes représentations cinétiques pour différents types d'inhibitions

	Sans inhibition	Inhibition compétitive	Inhibition non compétitive	Inhibition incompétitive
$V=f([S])$				
$\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> $\frac{1}{K_m''} = \frac{1}{K_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> $\frac{1}{V_m''} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> $\frac{1}{V_m''} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ </div>
$\frac{1}{v} = f([I])$				

Inactivation : inhibition IRréversible

- L'action d'un inhibiteur est **IRréversible** quand il se forme une **liaison covalente** entre l'enzyme et l'inhibiteur : on l'appelle un **inactivateur**.

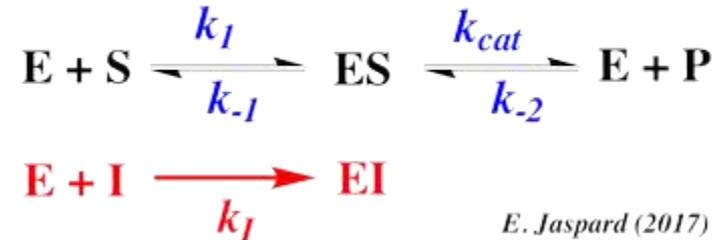


Remarque : la fixation de l'**inactivateur** n'est pas un équilibre.

- L'étude de l'effet des inhibiteurs **IRréversibles** est souvent utilisée pour déterminer les groupes actifs du site catalytique

Inhibition irréversible ou inactivation - équation de la vitesse

Inactivation



Attention : la fixation de l'inactivateur **n'est pas un équilibre**.

- **Concentration d'enzyme active**, c'est-à-dire qui n'a pas réagi avec l'inhibiteur :

$$\text{A tous moments : } [E_0] = [E]_{\text{active}} + [E]_{\text{inactivée}}$$

$$\text{Donc : } [E_0] = [E]_{\text{active}} + [EI]$$

Tant que $[I_0] \ll [E_0]$, tout l'inhibiteur réagit avec l'enzyme

$$: [EI] = [I_0]$$

$$\text{Donc } [E_0] = [E]_{\text{active}} + [I_0] \implies [E]_{\text{active}} = ([E_0] - [I_0])$$

- La **vitesse maximale est modifiée** :

- en **absence** d'inhibiteur : $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot [E_0]$

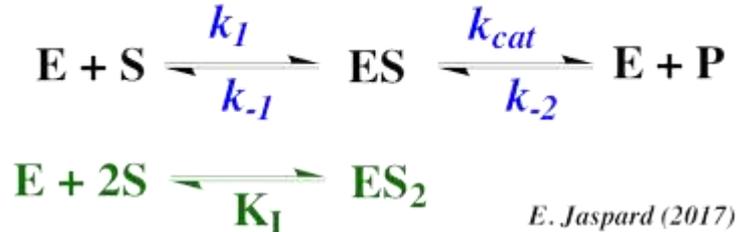
- en **présence** d'inhibiteur : $V_{\text{max}}^{\text{app}} = k_{\text{cat}} \cdot ([E_0] - [I_0])$

Inhibition par excès de substrat

- Ce type d'inhibition par le substrat lui-même peut avoir lieu quand il est en très grande concentration.
- En général, le site de fixation du substrat est dans ce cas de grande dimension et contient plusieurs sous - sites, chacun fixant une partie du substrat.

Le mécanisme réactionnel :

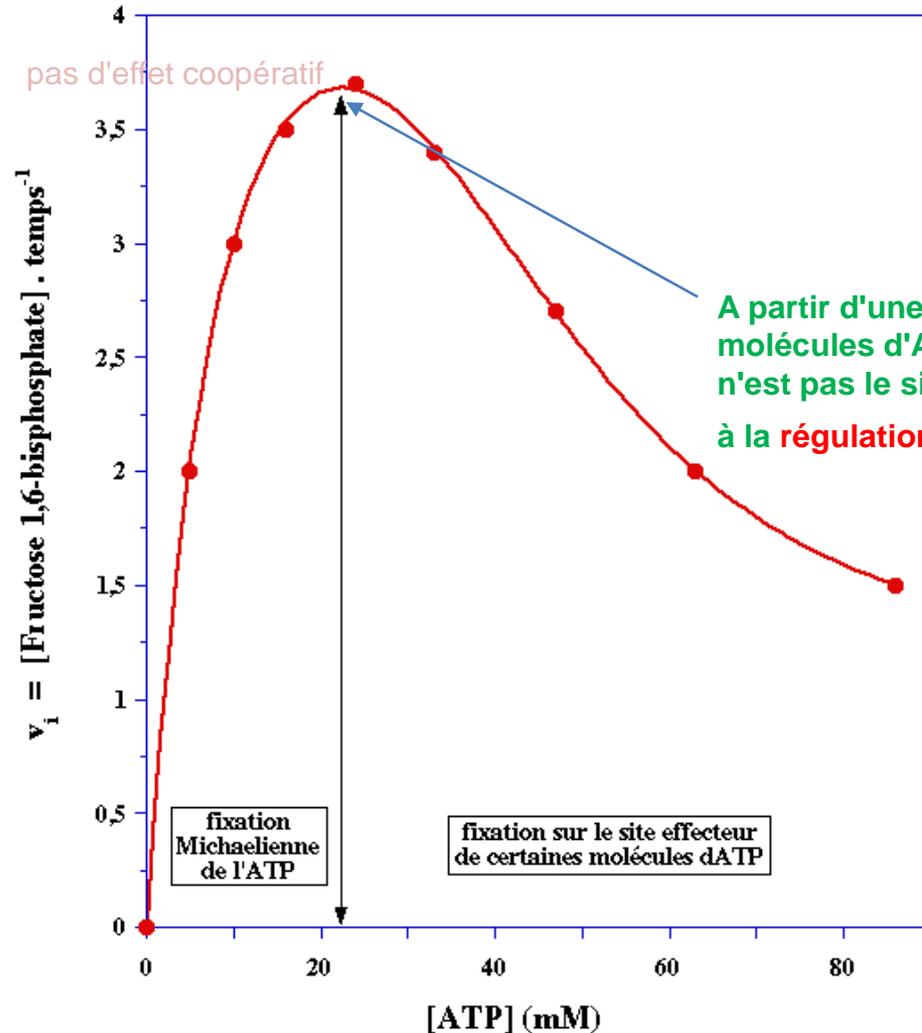
Inhibition par excès de substrat



- L'[acétylcholinestérase](#) est un exemple d'enzyme sujette à inhibition par excès de son substrat, l'**acétylcholine**.
- Un autre exemple est la régulation de la **phosphofructokinase-1** (enzyme de la [glycolyse](#)) par la concentration de ces substrats (l'ATP et le fructose 6-phosphate) mais aussi par celles de nombreux **effecteurs** liés à la production d'énergie ([ATP](#)) par la [phosphorylation oxydative](#).

L'ATP est un cas particulier : c'est l'un des deux substrats de la PFK mais c'est aussi un effecteur. En effet la PFK-1 possède :

- un site de fixation de l'ATP en tant que substrat (effet homotrope)
- un site de fixation en tant qu'effecteur (effet **hétérotrope**)



pas d'effet coopératif

L'allure hyperbolique de cette première partie de la courbe indique que la fixation de l'ATP aux 4 sites catalytiques s'effectue selon un mécanisme "Michaelien" ([voir le cours](#))

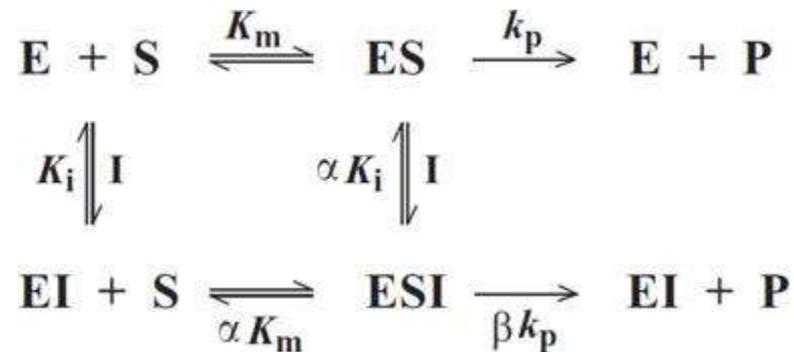
A partir d'une certaine concentration, des molécules d'ATP se fixent sur un site qui n'est pas le site catalytique : ce site est lié à la **régulation de l'activité catalytique**.

fixation Michaelienne de l'ATP

fixation sur le site effecteur de certaines molécules d'ATP

Autres mécanismes plus complexes

- Dans certains cas, bien que complexée à l'inhibiteur, l'enzyme peut catalyser la réaction (forme ESI - mécanisme ci-dessous) et former le produit.

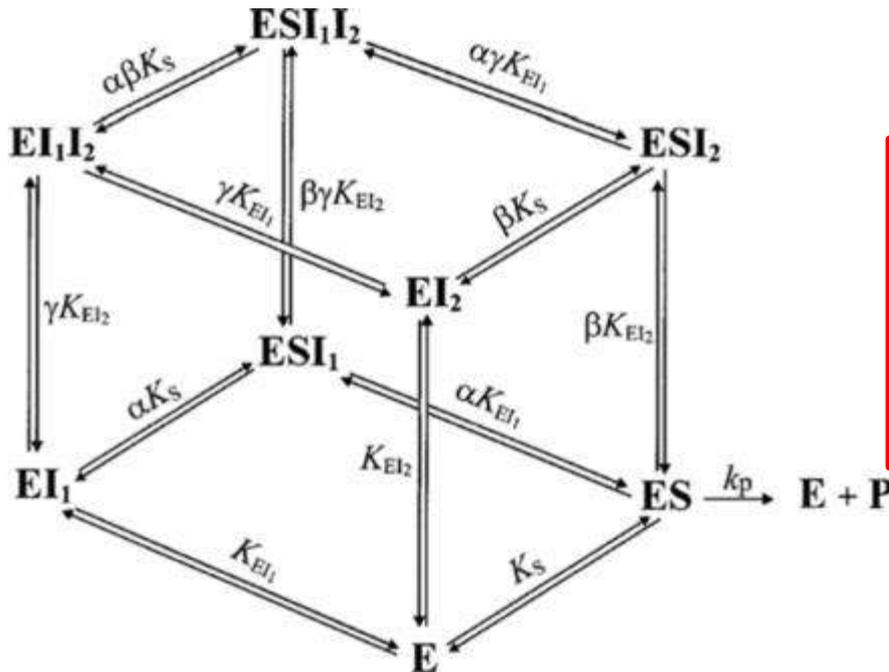


- Le facteur α** : le substrat se fixe sur E avec une plus forte affinité qu'il ne se fixe sur EI.
- Le facteur β** : le complexe ESI ne catalyse pas la réaction avec la même efficacité que le complexe ES.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)} + [S] \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[I]}{\alpha K_i}\right)}}$$

Deux inhibiteurs non exclusifs

- Les facteurs α et β (mécanisme ci-dessous) représentent la variation de l'affinité pour le substrat induite respectivement par I1 et I2 ou, à l'inverse, la modification de l'affinité pour les inhibiteurs due à la fixation du substrat.
- Le facteur γ représente l'influence que chaque inhibiteur a sur la fixation de l'autre inhibiteur.



$$\frac{v_0}{v_i} = 1 + \frac{[I_1]}{K_{EI1} \left(\frac{1 + [S]/K_S}{1 + [S]/\alpha K_S} \right)} + \frac{[I_2]}{K_{EI2} \left(\frac{1 + [S]/K_S}{1 + [S]/\beta K_S} \right)} + \frac{[I_1][I_2]}{\gamma K_{EI1} K_{EI2} \left(\frac{1 + [S]/K_S}{1 + [S]/\alpha\beta K_S} \right)}$$

TD2

Sol Ex 1

Sol Ex 3

Sol Ex 4

Sol Ex 5

Source : [Gledhill & Walker \(2005\)](#)

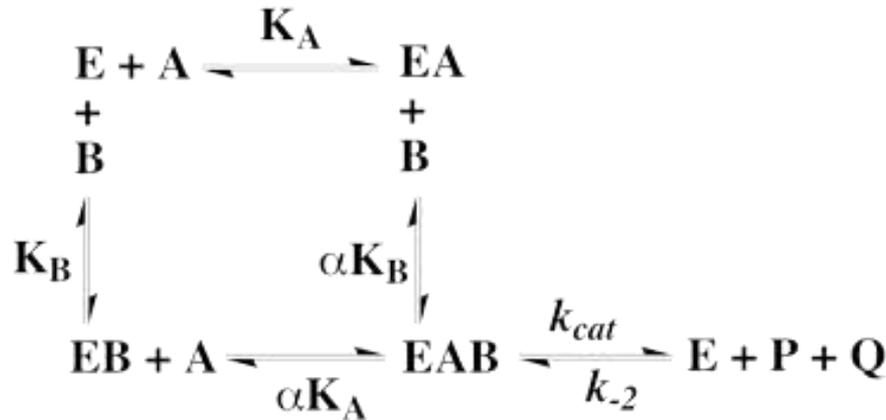
Les mécanismes à plusieurs substrats sont de 3 types :

- les mécanismes **séquentiels** (ou à simple déplacement) qui se subdivisent en mécanisme **séquentiel ordonné** ou mécanisme **séquentiel au hasard**.
- le mécanisme à double déplacement (ou mécanisme **Ping Pong**).

Systeme séquentiel (ou à simple déplacement) appelé "au hasard"

- Deux substrats, A et B, se fixent de manière **aléatoire** sur l'enzyme libre E (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats) avec une **constante de dissociation** K_A et K_B , respectivement
- Parfois la fixation de l'un des deux substrats modifie la constante d'équilibre de dissociation de l'autre substrat de l'enzyme libre d'un **facteur** α .

Le mécanisme réactionnel s'écrit :



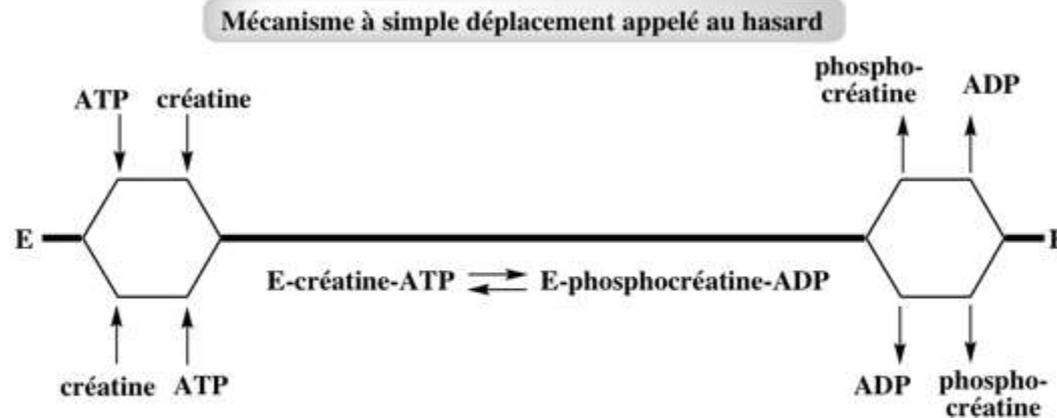
E. Jaspard (2017)

On aboutit à un ensemble de courbes de saturation pour chaque substrat :

$$v_i = f([A_0]) \text{ et } v_i = f([B_0])$$

Exemples d'enzymes

• Figure ci-dessous : la [créatine kinase](#) (E.C. [2.7.3.2](#)). Il s'agit d'un mécanisme **Bi Bi au hasard**. La glutathion S-transférase



E. Jaspard (2013)

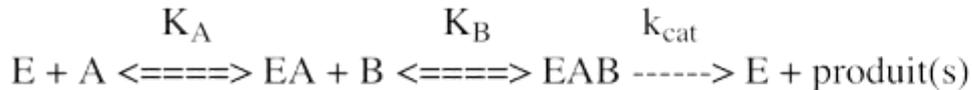
TD
Solution



Système séquentiel (ou à simple déplacement) appelé "ordonné"

- Dans un tel système, l'ordre de fixation est **obligatoire** : le substrat A doit se fixer à l'enzyme libre E **avant** le substrat B. En d'autres termes, le le substrat B ne peut se fixer qu'au complexe EA. Un complexe ternaire EAB est toujours formé.

Le mécanisme réactionnel s'écrit :



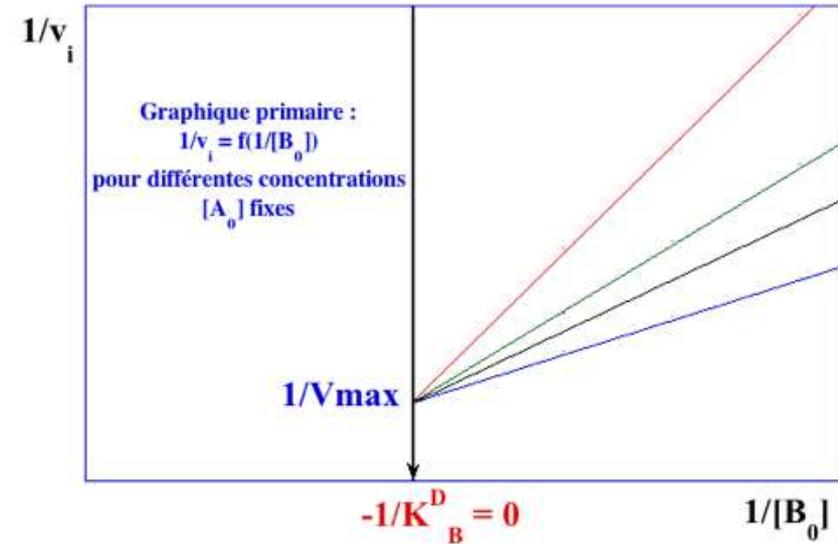
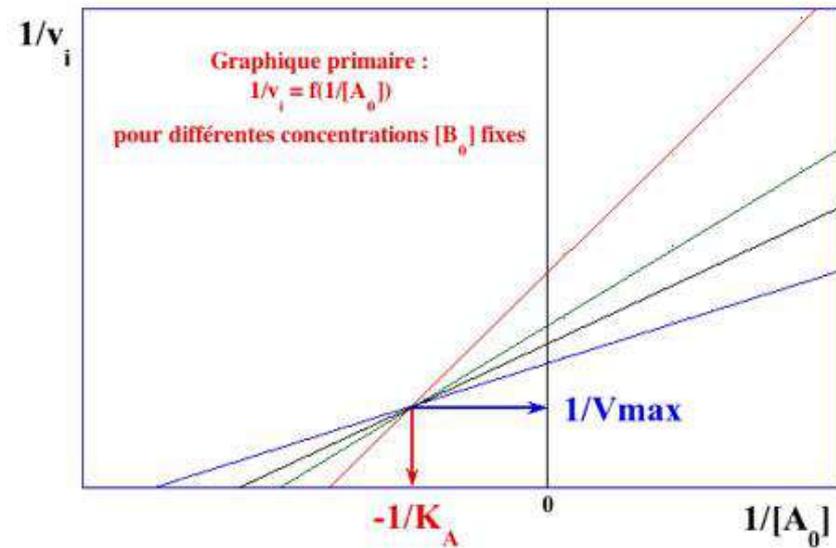
$$v_i = k_{cat} \cdot [EAB]$$

$$\text{Conservation des espèces : } [E_0] = [E] + [EA] + [EAB]$$

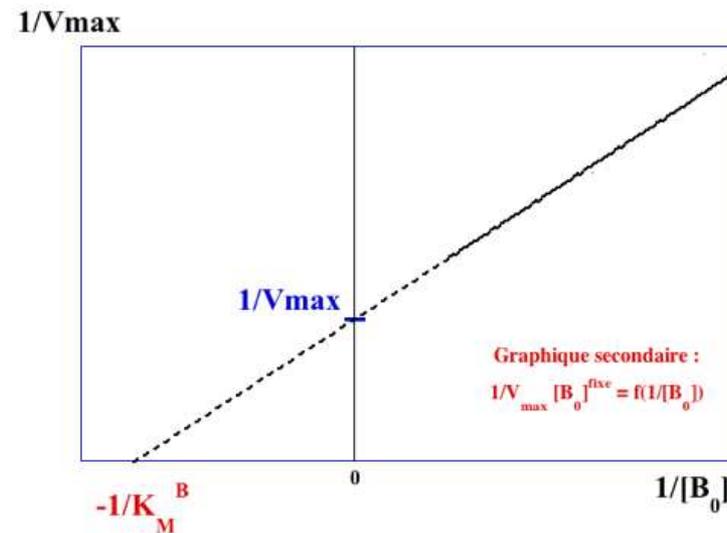
L'équation de chaque courbe de saturation en fonction de la concentration du substrat A pour une concentration fixe de B est :

$$v_i = V_M^{app} \cdot \left(\frac{[A_0] \cdot [B_0]}{(K_A^{app} \cdot K_B^{app}) + (K_B^{app} \cdot [A_0]) + ([A_0] \cdot [B_0])} \right)$$

- Le paramètre K_A (qui est également K_M^A) est déterminé à partir du **graphe primaire pour le substrat A** (ci-dessous) :



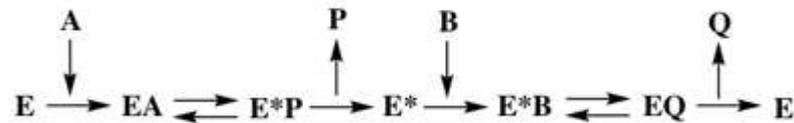
Les valeurs du graphe primaire pour le substrat A sont reportées dans le **graphe secondaire pour le substrat B** (ci-dessous) qui permet de déterminer : V_M et K_M^B .



Systeme à double déplacement appelé "Ping Pong"

Un ou plusieurs produits est/sont relargué(s) **avant** que tous les substrats ne soient fixés à l'enzyme. Ce mécanisme est caractérisé par la **formation obligatoire d'une forme intermédiaire modifiée** de l'enzyme (E^*) qui est un acyl-enzyme.

Mécanisme à double déplacement appelé ping-pong

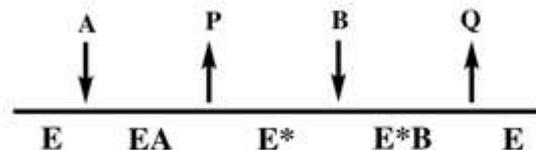


E. Jaspard (2013)

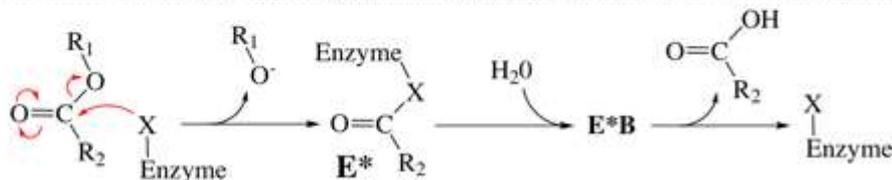
Exemples d'enzymes

- les aminotransférases : mécanisme **Bi Bi Ping Pong** (figure ci-dessous)

Mécanisme "ping-pong" de la chymotrypsine



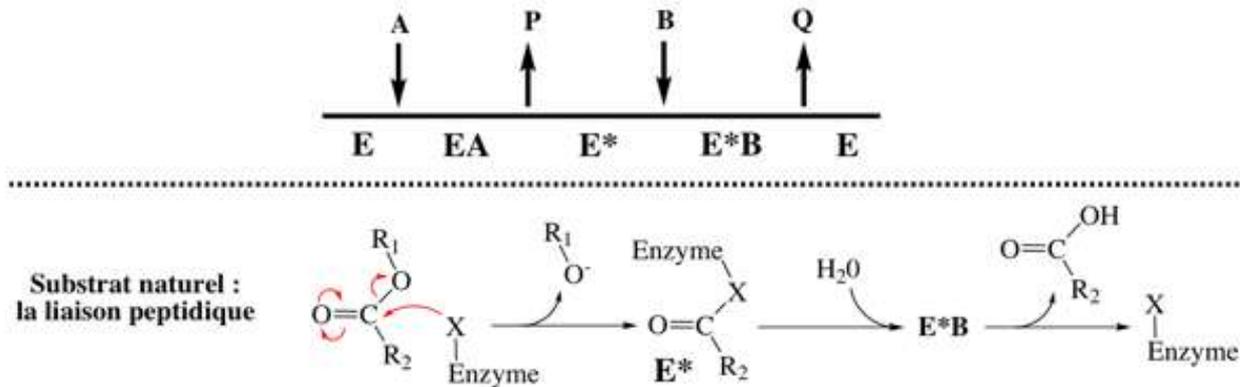
Substrat naturel :
la liaison peptidique



E. Jaspard (2014)

Certaines protéases à sérine (figure ci-dessous)

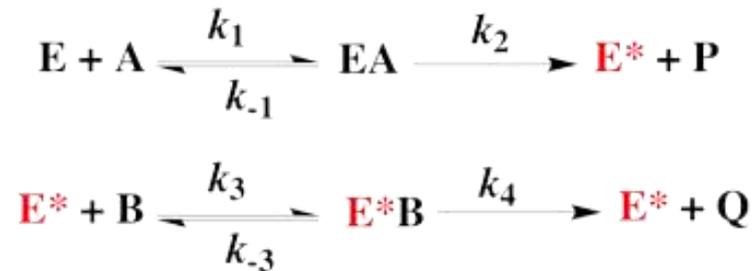
Mécanisme "ping-pong" de la chymotrypsine



E. Jaspard (2014)

- **Modèle cinétique**

Le mécanisme réactionnel s'écrit :



E. Jaspard (2017)

- Ce mécanisme est caractérisé par un **ensemble de droites parallèles** selon la représentation en double - inverses :

$$v_i = d[P]/dt = d[Q]/dt = k_2 \cdot [EA] = k_4 \cdot [E^*B]$$

$$[E_0] = [E] + [EA] + [E^*] + [E^*B]$$

L'équation des vitesses est :

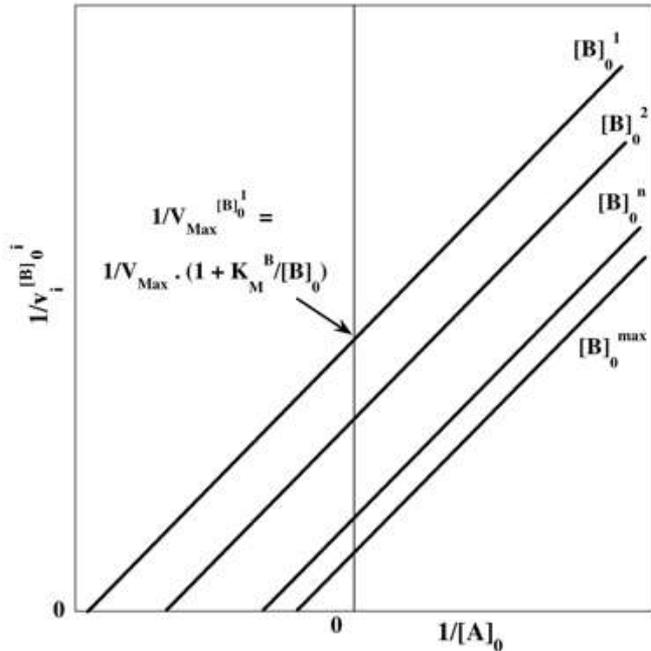
$$v_i = (k_{cat} \cdot [E_0]) \cdot \left(\frac{1}{1 + (K_M^A \cdot \text{terme A} \cdot 1/[A_0]) + (K_M^B \cdot \text{terme B} \cdot 1/[B_0])} \right)$$

Avec :

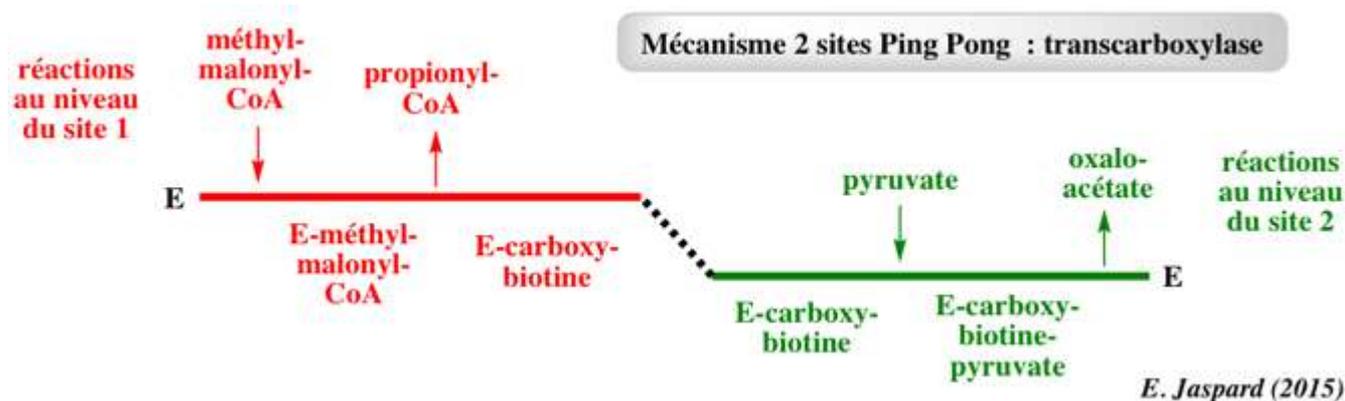
$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_4}{k_2 + k_4}$$

$$K_M^A = \frac{k_1 + k_2}{k_1} \quad \text{et} \quad K_M^B = \frac{k_3 + k_4}{k_3}$$

$$\text{terme A} = \frac{k_4}{k_2 + k_4} \quad \text{et} \quad \text{terme B} = \frac{k_2}{k_2 + k_4}$$



Mécanisme Ping Pong à 2 sites (ou plus)



- Sur un site : le méthyl-malonyl-CoA transfère son groupe carboxyle à la biotine pour former la carboxy-biotine-transcarboxylase et le propionyl-CoA est dissocié de l'enzyme.
- Sur l'autre site : le pyruvate se fixe indépendamment. La carboxy-biotine y est transférée et le pyruvate est carboxylé en oxaloacétate qui se dissocie de l'enzyme.

Les équations des vitesses sont **identiques** au mécanisme Ping Pong classique mais les profils d'inhibitions sont **inversés**.

références bibliographiques

- "Principes de Biochimie" Horton, Moran, Ochs, Rawn et Scrimgeour (1994) - Ed. DeBoeck Universités - ISBN : 2-8041-1578-X
- Simm *et al.* (2005) "*Bulgecin A: a novel inhibitor of binuclear metallo- β -lactamases*" *Biochem. J.* 387, 585 – 590.
- Gledhill & Walker (2005) "*Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria*" *Biochem. J.* 386, 591 – 598.
- Lunn *et al.* (2008) "*Mutational analysis of conserved glycine residues 142, 143 and 146 reveals Gly142 is critical for tetramerization of CTP synthase from Escherichia coli*" *Biochem. J.* 412, 113 – 121
- **N.B.** Les TD corrigés de chaque partie du cours, sont insérés à la fin de chaque partie: **suivre les liens hypertextes.**

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

