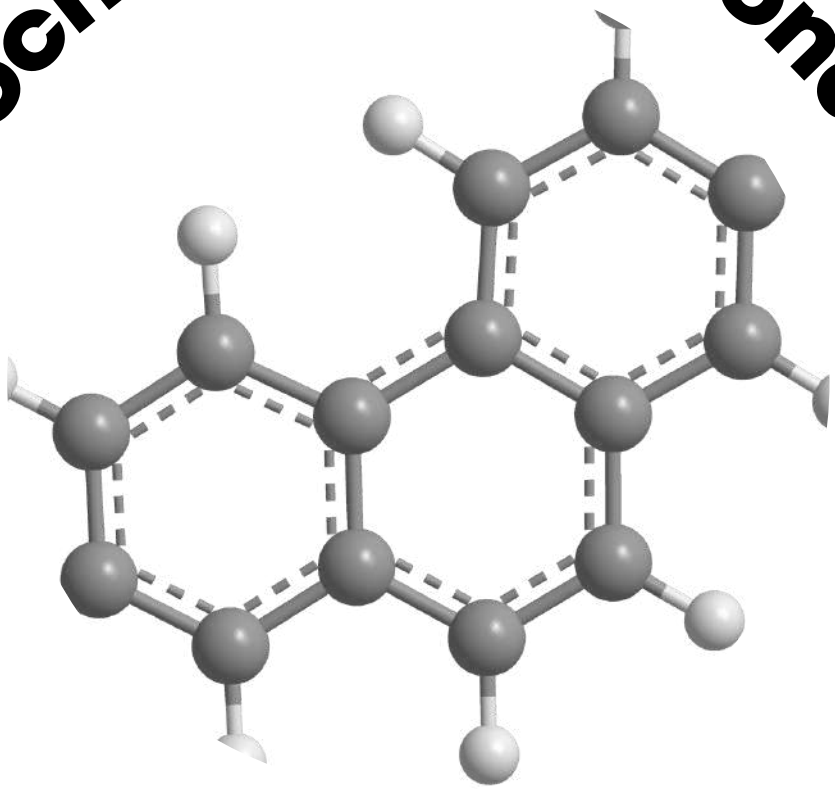
@Mohamed_Nahli

BIOLOGIE MAROC
www.biologie-maroc.com

Biochimie Approfondie



SCIENCES DE LA VIE

Shop
• Cahiers de Biologie + Lexique
• Accessoires de Biologie

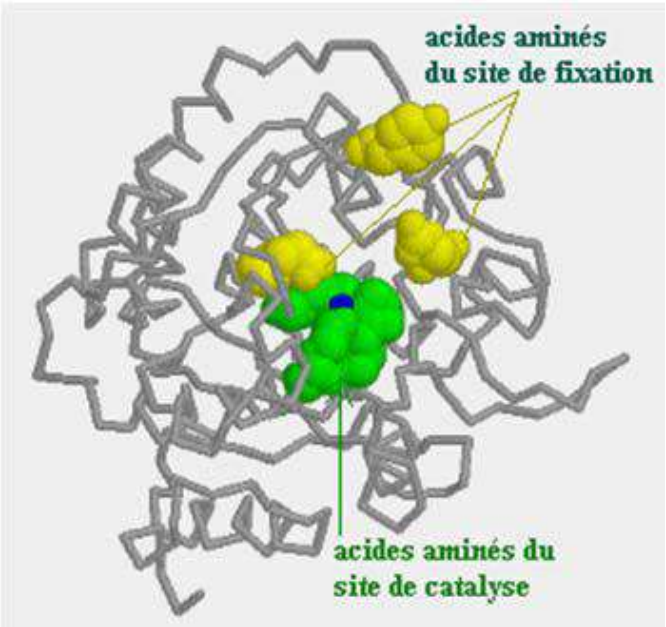
Etudier
Visiter Biologie Maroc pour étudier et passer des QUIZ et QCM enligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.

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

جامعة مولاي إسماعيل
UNIVERSITÉ MOULAY ISMAÏL
كلية العلوم
FACULTÉ DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Support pédagogique

Enzymologie Approfondie



Pr. Lhoussain HAJJI

Année universitaire : 2019-2020

Propriétés générales des enzymes

Introduction :

Certaines protéines sont douées d'activité catalytique spécifique ; il s'agit des **enzymes**.

Ils sont doués :

- Une spécificité d'action
- Une spécificité de substrat
- Un pouvoir catalytique qui est soumis à régulation

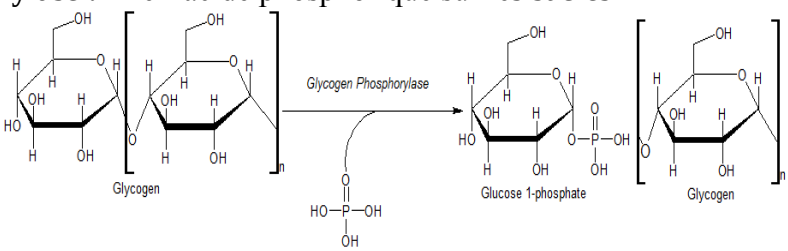
I- Généralités :

- Les enzymes sont des **catalyseurs biologiques** de réactions métaboliques.
- Il s'agit de protéines globulaires douées d'activité enzymatique
  - Une enzyme accroit la vitesse d'une réaction chimique, et ne catalyse qu'un seul type de réaction dont elle est spécifique ; **L'enzyme est spécifique d'un substrat.**
  - La synthèse de leur partie protéique par les cellules qui les utilisent, selon le phénomène de synthèse protéique.

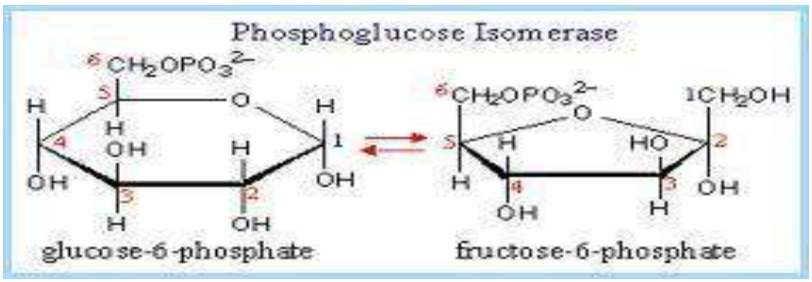
Rôle : Ils interviennent dans diverses réactions de dégradation, ou de synthèse

Exemple :

Phosphorylase : fixe l'acide phosphorique sur les sucres



Isomérases : Transforment une molécule en son isomère



II- Définition d'une enzyme :

Les enzymes sont des protéines douées d'activité catalytique spécifique

III-Structure des enzymes :

Les enzymes sont des protéines globulaires, elles adoptent plusieurs degrés d'organisation :

1- **Structure primaire :** se définit par la séquence en acides aminés
2- **Structure secondaire :** La séquence en acides aminés subit des repliements pour former des motifs (hélices α et feuillet β)
3- **Structure tertiaire :** Former par l'association de plusieurs motifs, donnant une forme spatiale à la protéine.

Cette organisation entraine une localisation :

- Des acides aminés polaires en surface externe
- Les acides aminés non polaires vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne)

C'est au niveau de cette zone que se situe le site actif d'une enzyme

Pour qu'une enzyme soit fonctionnelle, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.

4- **Structure quaternaire :** Association de plusieurs chaines protéiques

- Une chaine : monomère
- Plusieurs chaines : oligomère

Cette structure est adoptée par les enzymes régulatrices

Certaines enzymes sont actives par euxmêmes, sans autre groupes fonctionnels ; d'autres au contraire nécessitent la présence d'un composé non protéique : **Co-facteur** Le co-facteur est soit :

- Un ion métallique appelé activateur (Fe^{+2}, Mg^{+2})
- Molécule organique : appelée co-enzyme

IV-Propriétés générales des enzymes :

Les enzymes possèdent des caractéristiques qui les rendent uniques

1- **Propriétés d'un catalyseur chimique :**

- Un catalyseur augmente la vitesse d'une réaction, mais la présence de catalyseur ne provoque pas de réaction de réaction, ou rend possible une réaction qui ne l'est pas sur le plan thermodynamique ($\Delta G<0$)
- Un catalyseur abaisse l'énergie d'activation
- Il se trouve intacte a la fin de la réaction
- Au cours des réactions chimiques réversibles, le catalyseur accélère de la même manière les 2 vitesses de réaction évoluant simultanément en sens inverse.

  Il ne modifie pas l'équilibre final de la réaction

Toutes ces caractéristiques sont applicables aux enzymes, mais les enzymes sont plus efficaces que les catalyseurs

- Ils agissent à très faible dose
- Ils abaissent l'énergie d'activation d'une manière plus importante qu'un catalyseur

2- Nature protéique :

Toutes les enzymes sont des protéines

3- Spécificité des enzymes :

Les enzymes sont hautement spécifiques, on distingue :

Spécificité de substrat :

Définition d'un substrat :

La molécule liée au site actif et sur laquelle l'enzyme va agir est appelée substrat

La spécificité de substrat est variable, certaines enzymes ont une spécificité **absolue** ; transformant un substrat unique en un produit unique Exemple :

Glucokinase : phosphoryle que le glucose

D'autres ont une spécificité **plus large**, transformant le substrat d'une classe de substrat en autant de produits

Hexokinase : phosphoryle divers hexoses, dont le glucose

Spécificité d'action :

Une enzyme ⟶ Une seule réaction catalysée

Kinases : Ne catalysent que les réactions de phosphorylation en présence d'ATP

Décarboxylases : catalysent la décarboxylation des molécules contenant un groupement carboxyle

4- Régulation de leurs activités catalytique :

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

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

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

Exemple :

La phosphofructokinase est activée par l'AMP et inhibée par l'ATP.

Cette modulation active ou inhibe la glycolyse selon que la charge énergétique est faible ou élevée.

V- Classification des enzymes :

- La commission des enzymes et l'union internationale en biochimie a établi une classification et une nomenclature systémique, comportant :
  - 6 classes
  - Chacune subdivisée en sous classe

1) **Oxydoréductase :** assure une oxydoréduction
2) **Transférase :** assure un simple transfert
3) **Hydrolase :** assure une hydrolyse
4) **Lyase :** assure une addition sur une double liaison
5) **Isomérase :** assure une réaction d'inter conversion d'isomères
6) **Ligase ou synthétase :** catalyse les réactions de création de liaisons (C-C/ C-N / C-S)

À chaque enzyme est attribué un numéro à 4 chiffres et un nom systématique qui identifie la réaction catalysée

- 1er chiffre : Classe
- 2e chiffre : sous classe de l'enzyme
- 3e chiffre : sous sous classe de l'enzyme
- 4 e chiffre : groupe Exp :

Glucose + ATP ⟶ ADP+ Glucose 6 phosphate

Enzyme : ATP Glucose Phosphotransférase (2.7.1.1)

Cependant d'une manière générale, la dénomination internationale d'une enzyme comprend :

- Nom de la classe de l'enzyme
- Celui du substrat

Créatine+ ATP ⟶ Phosphocréatine+ ADP
Enzyme : **Créatine phosphotransférase**

Les enzymes qui catalysent le transfert de groupement phosphate sont appelés :
Kinases
Nom classique de l'enzyme : **Créatine kinase**

Phosphatases : les enzymes qui coupent le groupement phosphate
Phosphorylases : les enzymes qui hydrolysent les liaisons osidiques et assurent le transfert d'un groupement phosphate

VI- Site actif des enzymes :

- Les enzymes sont des protéines, elles ont des interactions avec d'autres molécules qui peuvent être protéique ou non protéique ; c'est molécules sont appelées **ligands**
- Le substrat est un ligand spécifique des enzymes
- Les interactions entre enzymes et substrat font intervenir des liaisons non covalentes :
  - Liaisons hydrogènes
  - Liaisons de Van der waals
- Ces interactions entre enzymes et substrat sont des réactions spontanées, qui ne nécessitent aucune énergie.

- Cette interaction fait intervenir :
  - **Un phénomène de reconnaissance très spécifique**
  - **Un phénomène d'attraction**
- Une protéine dénaturée par la chaleur est incapable de lier son ligand ; L'activité enzymatique et la spécificité des enzymes dépendent de l'hélicité et de la conformation spatiale de la protéine.

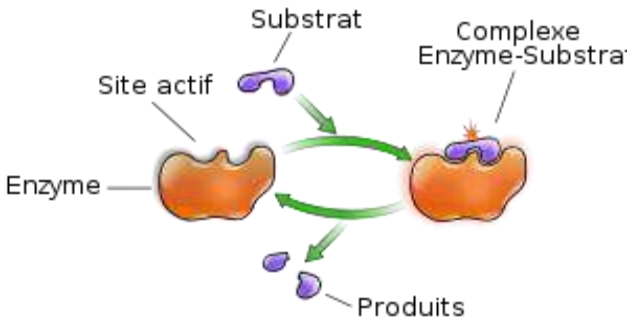
1) Définition :

Le site actif est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, situé dans la zone hydrophobe de la protéine, au niveau de laquelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique de l'enzyme. Il est subdivisé en 2 parties :

a- Site de liaison, fixation, et reconnaissance :

Reconnait la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme **b- Site catalytique :**

Permet la réaction transformant le substrat en produit



Il comprend 3 types d'acides aminés :

1- **Acides aminés contributeurs :**
Permettent à la protéine enzymatique d'adopter une conformation spatiale pour que le ligand puisse s'adapter à la protéine

2- **Acides aminés auxiliaires:**
Assurent la mobilité des zones situées au voisinage du centre actif

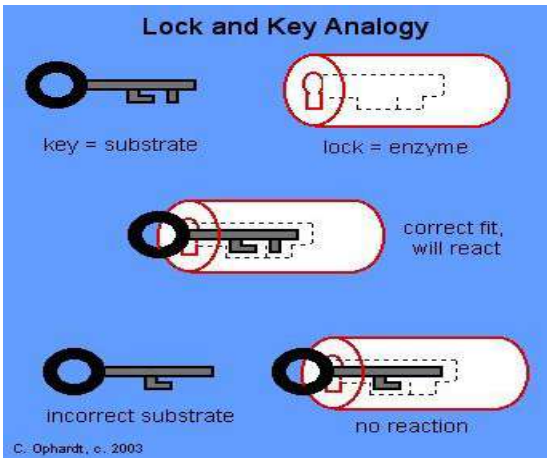
3- **Acides aminés de contact :** Lieu de la réaction enzymatique
Fait intervenir des groupements particuliers de ces acides aminés de contact, qui interagissent avec un ou plusieurs groupements particuliers du substrat.

VII- Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat :

La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du site actif.
Le site actif doit être dans une conformation spatiale telle que le substrat puisse s'y fixer, il existe différents modèles

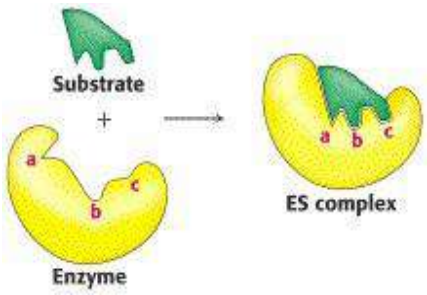
1- **Modèle de Fisher :** Clé-serrure

Dans ce modèle, la formation du complexe enzyme-substrat **ES** nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique.
Ce modèle explique la spécificité de l'enzyme pour son substrat, mais il n'explique pas l'effet des effecteurs



2- **Modèle de Koshland :** Ajustement induit

L'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat.



3- **Modèle de Strain-Jenks :**

L'enzyme et le substrat lorsqu'ils ne sont pas dans le milieu présentent chacun une conformation particulière

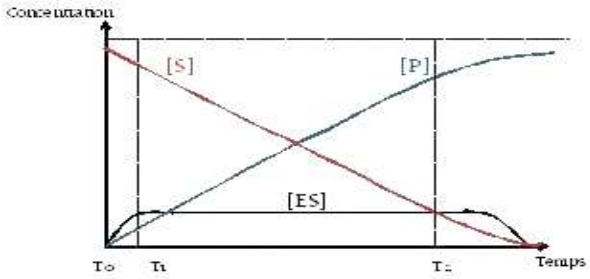
La présence mutuelle de ces 2 molécules entraine une déformation partagée de l'enzyme et du substrat, de manière à ce que le substrat se fixe sur les fonctions complémentaires des acides aminés de contacts

2- La Cinétique enzymatique à un substrat

I- Définition de la cinétique enzymatique :

C'est l'étude **des vitesses de réactions** et de leurs **modifications,** en réponse aux changements **des conditions expérimentales.**

II- Les différentes phases de la réaction enzymatique :



Evolution de la cinétique enzymatique

Différentes phases	Pré-stationnaire	Stationnaire	Post stationnaire
Caractéristiques	Enzyme mise en présence d'excès de substrat Combinaison ES très rapide	Enzyme saturée par le substrat Combinaison ES est à concentration maximale Constante Vitesse de la réaction est Constante : **Vitesse initiale** (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme)	Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme

S ↗ : La vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en substrat : Réaction **d'ordre 0**

Faible quantité de S : La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en substrat : **Réaction d'ordre 1**

Travailler en concentration saturante en substrat

III- Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique :

S'exprime par :

- La quantité de substrat métabolisé par unité de temps

  V= - dS / dt

- Ou par la quantité de produit formé par unité de temps

  V= dP / dt

  (Dans les conditions optimales)

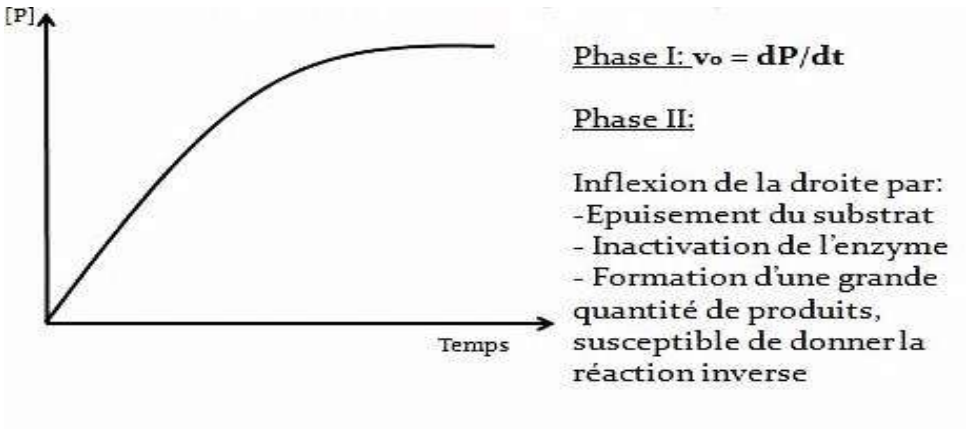


Figure 1 : Variation de la concentration en produit en fonction du Temps

Il est indispensable D'étudier la vitesse initiale de réaction dans les conditions ou la :

[S] > [E]

Si le temps de la réaction est très court, la modification de **[S]** est négligeable, et **[S]** peut être considéré comme **constante**

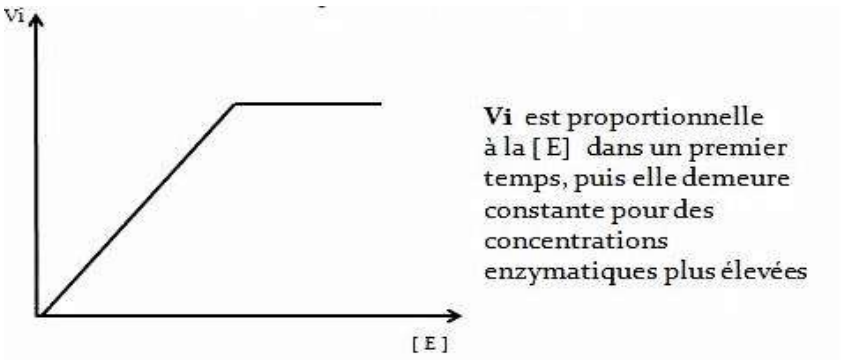


Figure 2 : Influence de la concentration en enzyme sur la Vi

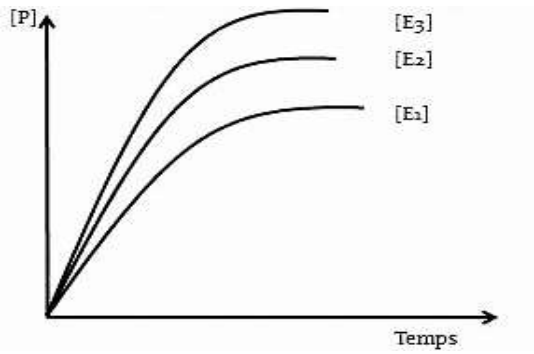
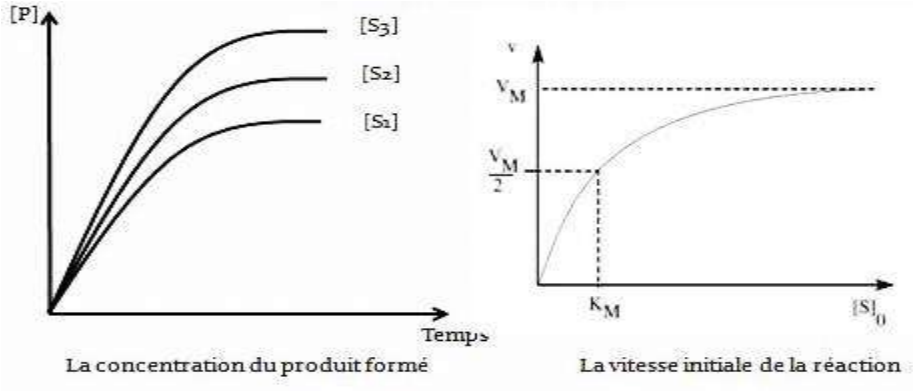


Figure 3 : Influence de la concentration en enzyme sur la concentration en produit

Figure 4 : Influence de la concentration croissante du substrat sur :

- La concentration en produit
- La vitesse de la réaction



Conclusion :

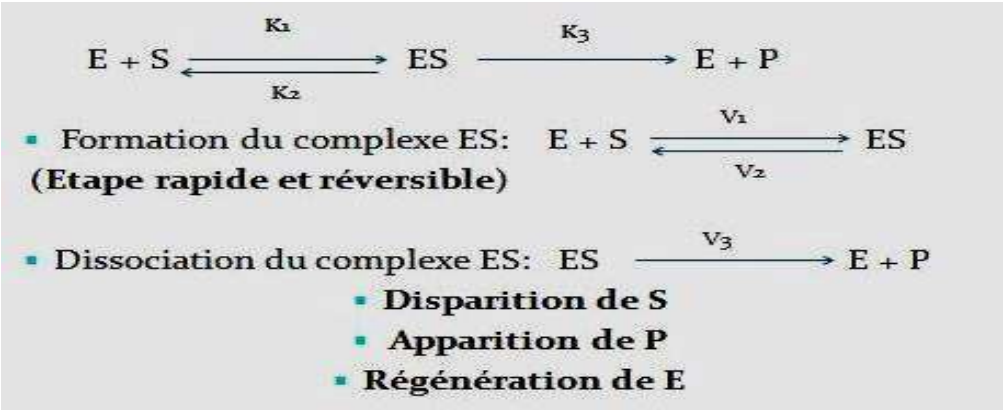
[S] est saturante

L'enzyme est en pleine activité et tous les sites actifs sont saturés

En pratique,

Détermination d'une activité enzymatique lorsque [S] est saturante (en excès)

IV-Hypothèse de Michaelis-Menten :



1- La constante de Michaelis :

D'après la loi d'action de masse :

$$V1 = k1\,[E][S]$$
$$V2 = k2\,[ES]$$

Vitesse d'apparition des produits : **dP/dt= V3= k3.[ES]**

La vitesse de disparition des substrats est égale à la vitesse d'apparition du **produit : dS/dt = dP/dt**

La vitesse de disparition des substrats : - dS/dt= V_1-V_2

V1-V2= V3

k1. [E].[S]= (k2 + k3).[ES]

$$\frac{k2 + k3}{K1} = \frac{[E].[S]}{[ES]} = Km$$

Km : Constante de dissociation du complexe ES
Constante de Michaelis

Valeur de Km est d'autant plus élevée que la :

- dissociation du complexe ES est forte
- Et donc que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible

2- L'équation de Michaelis :

[Et] : Concentration de l'enzyme présente dans le système

[E] = [Et]-[ES]

Km = [E][S] = ([Et]-[ES]) [S]

$$\frac{}{[ES]} \qquad \frac{}{[ES]}$$

$$Km + [S] = \frac{[Et]\,[S]}{[ES]} \qquad [ES] = \frac{[Et]\,[S]}{Km + [S]}$$

V= vitesse de la réaction enzymatique= V3

V= V3= k3 [ES]

$$V = \frac{k3.\,[Et]\,.[S]}{Km + [S]}$$

La vitesse de la réaction dépend de la :

- concentration en enzyme totale
- Concentration en substrat
- De la constante de Michaelis

La vitesse est maximale lorsque [ES] sera la plus grande possible :

Lorsque la totalité de l'enzyme sera combiné au substrat

[Et] =[ES] Vm=K3.[Et]

$$V = \frac{Vm\ .[S]}{Km + [S]}$$

Interprétation et intérêts :

1- V= Vmax/2 = $\frac{Vm\ [S]}{Km + [S]}$

Km= [S] lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse max

2- Quand la concentration initiale en substrat est très supérieure à Km (Km négligeable)

Vi =Vm = kcat. [Et]

(**kcat est l'efficacité catalytique)**

3- Quand la concentration initiale en substrat est très inférieure à Km (**[S]** négligeable)

Vi =kcat /km.[Et][S]

kcat/Km : La **constante de spécificité**

Km est fonction des constantes de vitesse de chacune des étapes de la catalyse :

$$Km = \frac{k2+k3}{k1}$$

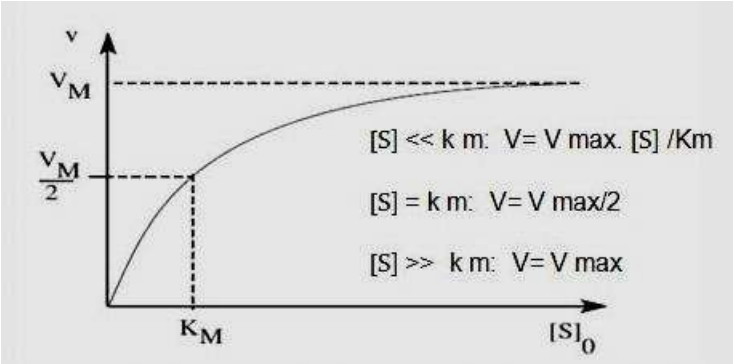
Si k2>k3 : dissociation de ES est plus rapide que la formation de E et P

Km= k2/k1 : constante de dissociation Ks

Km : mesure de la stabilité du complexe ES

Km élevé : liaison faible

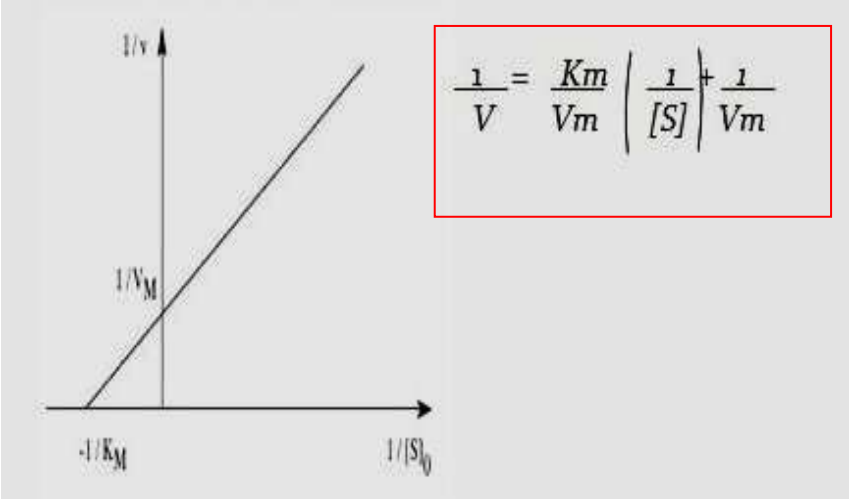
Km faible : liaison forte



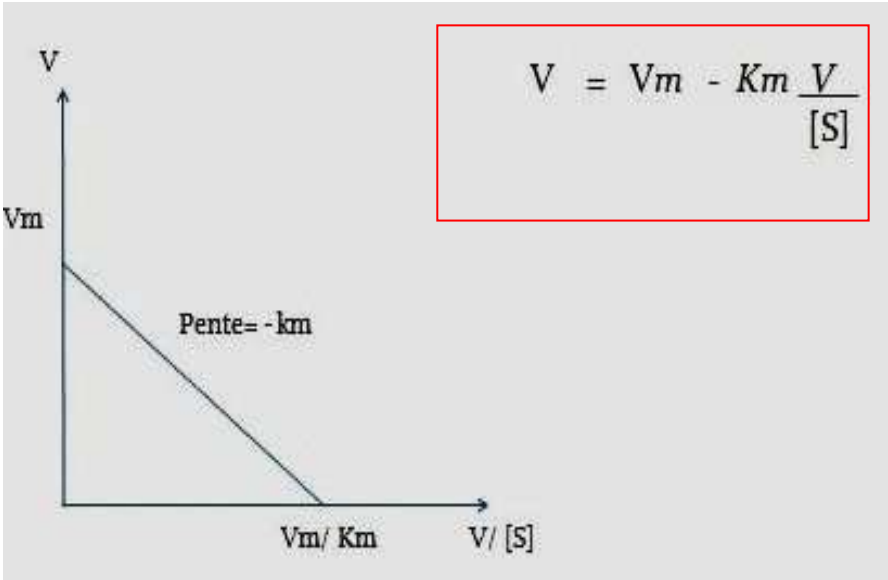
3- Méthode de détermination de la constante de Michaelis :

a- Méthode arithmétique : V= Vmax/2 Km= [S]

b-Méthode graphique de Line weaver et Burk:



c- Méthode graphique d'Eadie Hofstee:



3-Définition des unités enzymatiques 1-

Unité internationale :

Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure

UI= µ mol/min

Activité enzymatique= V max

UI/ unité de volume

2- Katal : Quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde

3- Activité spécifique :

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par milligramme d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\text{mg de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\text{mg de protéine}}$$

Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

4-Activité spécifique moléculaire :

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par molécule d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\mu \text{ mol de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\mu \text{ mol de protéine}}$$

Détermination de l'activité enzymatique :

En cinétique:

Do= ε . C. l **C= Do. 1/ ε .1/l**

Activité enzymatique en UI/l = Δ Do/ Δt . 1/ ε . 1/l . Vt/Ve .10 ^{6}

Δt : temps de mesure en min

ε : coefficient d'absorption molaire **($mol^{-1}.l.cm^{-1}$)**

l : trajet optique

Vt : volume du mélange réactionnel total ou se fait la mesure

Ve : volume du milieu contenant l'enzyme à doser

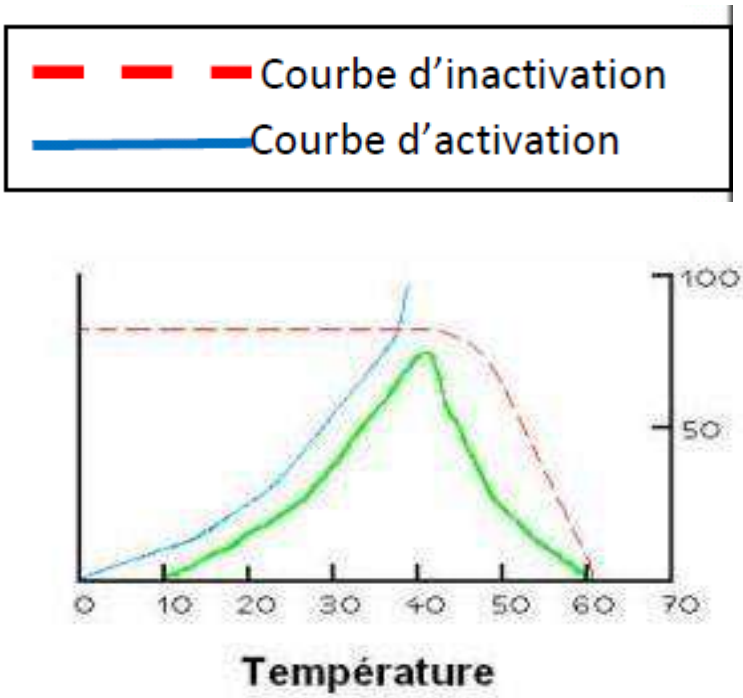
4- Influence des agents physiques et chimiques sur la cinétique:

A- Influence des agents physiques :

1- **Influence de la température :**

2- effets sur la réaction enzymatique :

- ✓ Elle accélère la réaction en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation
- ✓ Une température élevée fragilise les liaisons et rend la structure tertiaire instable, pour dénaturer la protéine ;
- ✓ Il y aura diminution de l'activité catalytique



Température basse :

La température augmente la vitesse enzymatique puisque l'interaction entre l'enzyme et son substrat devient plus importante à forte température.

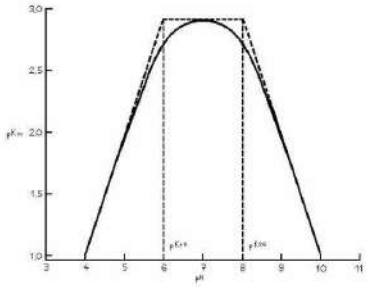
Température élevée :

À fortes températures la protéine se dénature et perd donc son activité enzymatique.

L'activité enzymatique augmente jusqu'à une température optimale puis diminue pour atteindre une activité nulle à de grandes températures.

A la température optimale l'activité enzymatique est la plus importante. Cette température optimale varie d'une enzyme à un autre.

2- Influence du pH :



- ✓ aux valeurs extrêmes :

il dénature la protéine en modifiant l'état d'ionisation des chaines latérales des acides aminés

- ✓ aux valeurs intermédiaires :

il influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation des chaines latérales des acides aminés du site actif et du substrat

3- **Force ionique :**

La présence d'ions dans le milieu réactionnel joue un rôle important :

- Certaines enzymes nécessitent des activateurs (ions métallique)
- Solubilité maximale pour une concentration faible en sels neutres

4- **Effet de radiation :**

Les émissions radioactives α, β, γ, rayons X, et les neutrons peuvent directement ou indirectement entrainer l'inactivation des enzymes :

Direct : Ionisation des molécules

Indirect :

Ionisation du milieu réactionnel

Formation de radicaux libres qui attaquent les enzymes

B- Influence des agents chimiques :

1-Définition d'un effecteur :

Est tout corps chimique, minéral ou organique capable de modifier la cinétique des réactions enzymatiques

Il peut être soit activateur ou inhibiteur

I- Activateurs enzymatiques : Définition :

Est tout agent chimique, qui par sa liaison avec l'enzyme accélère la vitesse de la réaction enzymatique

1- Ions métalliques : Fixation par coordinance à des atomes d'oxygène, d'azote, des groupements COOH,
NH2 des enzymes

- Ils confèrent une grande stabilité dans le site actif de l'enzyme L'ion métallique favorise :
- Une bonne conformation de l'enzyme
- La fixation du substrat
- participe de manière directe à la catalyse

Exemple : Kinases activées par Mg^{+2}

2- Activation des pro-enzymes inactifs :

La plupart des enzymes protéolytiques sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs,
L'élimination d'une séquence d'acides aminés le rend actif

Trypsinogène ⟶ Trypsine + Hexapeptide

3- Activation par fixation covalente d'un groupement chimique :

Par addition d'un groupement chimique, le plus souvent le phosphate

Phosphorylase b **inactive** ⟶ Phosphorylase a **active**

Phosphorylation d'un résidu séryl par une kinase:

Phosphorylase b kinase

II- Les inhibiteurs enzymatiques :

Définition :

Est tout effecteur, qui par sa liaison avec l'enzyme **ralentit** la vitesse de la réaction enzymatique **Intérêt :**

- Mécanisme essentiel de contrôle des systèmes biologiques
- Source d'information sur le mécanisme d'action des enzymes

1- Les inhibiteurs irréversibles :

Se lient de façon irréversible avec l'enzyme
Agissent brutalement en dénaturant l'enzyme
Exemple : 5Fluoro-uracile utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse

Inhibe la **thymidilate synthase** ; enzyme qui intervient dans la synthèse de la thymine (ADN)
Arrêt de la multiplication des cellules tumorales

2- Les inhibiteurs réversibles :

- Perturbent la cinétique et peuvent stopper la réaction
- L'inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières Ont un grand intérêt puisqu'ils permettent une étude très fine des mécanismes moléculaire de la catalyse.

a- Les inhibiteurs compétitifs:

- Comportent une analogie structurale avec le substrat
- Entre en compétition avec les molécules de substrat pour se lier au site actif
- Se lie de façon réversible

Diminue la vitesse de catalyse en abaissant la proportion de molécules d'enzyme liées au substrat

- A concentration élevée en substrat, le substrat entre en compétition avec les molécules inhibitrices pour se lier au SA, et les déplacés des centres catalytique

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

$$E + I \underset{k_2'}{\overset{k_1'}{\rightleftarrows}} EI$$

$$V_{app}\,[ES] = V_{disp}\,[ES] \qquad \frac{K_2+K_3}{K_1} = \frac{[E].\,[S]}{[ES]} = K_m$$

$$V_{app}\,[EI] = V_{disp}\,[EI] \qquad \frac{K_2'}{K_1'} = \frac{[E].\,[I]}{[EI]} = K_i$$

$$[EI] = \frac{[E].[I]}{Ki} = \frac{[ES].[I].Km}{[S]\ Ki}$$

$$[Et] = [E] + [EI] + [ES]$$

$$= \frac{[ES].Km}{[S]} + [ES] + \frac{[ES].[I].Km}{[S]\ Ki}$$

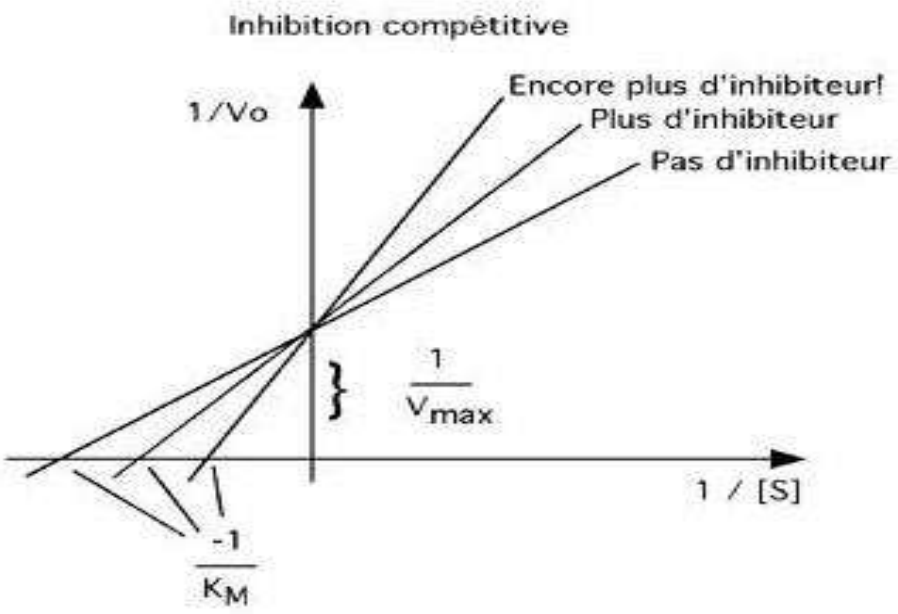
$$= [ES].\left(1 + \frac{Km}{[S]} + .\frac{[I].Km}{[S].Ki}\right)$$

$$[Et] = [ES].\left(1 + \frac{Km}{[S]}.\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)\right)$$

$$V = K_3.[ES] \ / \ Vmax = K_3.[E\,t]$$

$$V = \frac{V\,max}{1 + \frac{Km}{[S]}.\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)} = \frac{V\,max.[S]}{[S] + Km.\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)}$$

$$\boxed{\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmax}\left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right).\frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}}$$



Pente de la droite est multipliée par un facteur : **1+ [I]/Ki**
V max non modifiée

La constante de Michaelis est augmentée :

Dissociation de ES est favorisée

L'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue

b- Les inhibiteurs non compétitifs :

- Se lie de façon réversible à un site autre que le site actif
- Il provoque une modification de la conformation de l'enzyme
- L'enzyme peut se lier :

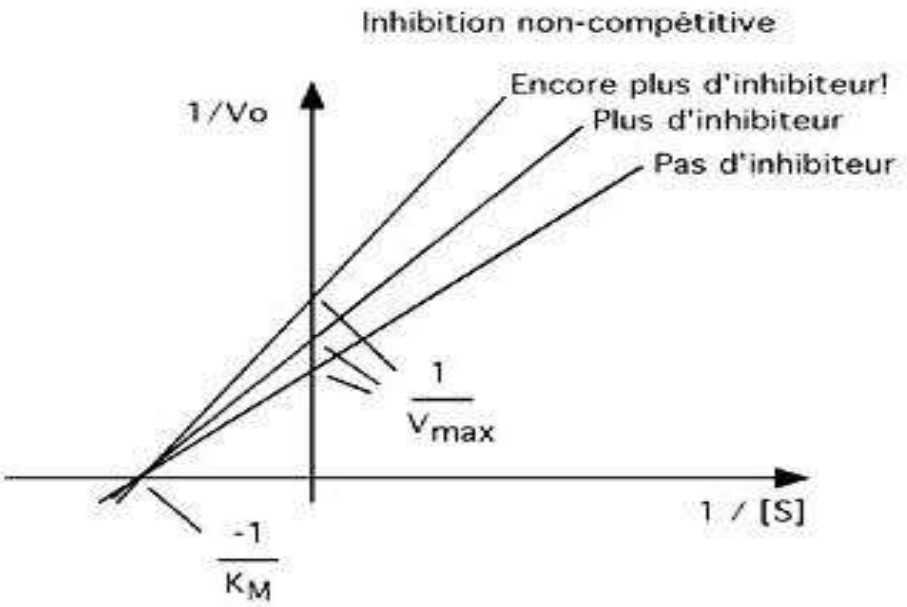
- l'inhibiteur
- au substrat
- à l'inhibiteur et au substrat à la fois

- L'enzyme est inactivée quand l'inhibiteur est lié, en présence ou non du substrat.
- L'effet de l'inhibiteur n'est pas inversé par l'augmentation de la concentration en substrat

L'inhibiteur diminue la concentration de l'enzyme active

En

Abaissant la vitesse maximale



$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right) + \frac{1}{Vmax} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)$$

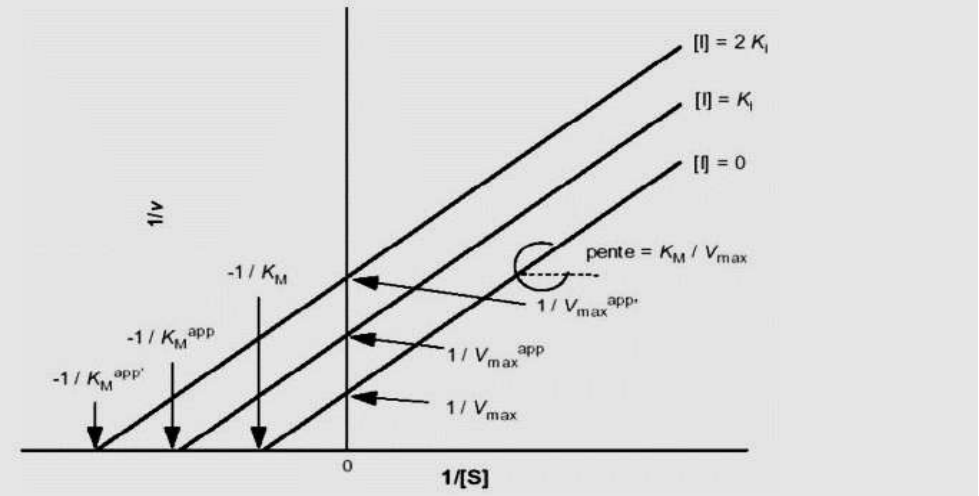
Interprétation :

Km inchangée

V max est abaissée

c- Les inhibiteurs incompétitifs :

L'inhibiteur ne se lie pas à l'enzyme libre, mais uniquement au complexe ES



Pente non modifiée

Km ↗

Vmax ↘

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{V\,max} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)$$

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats

Introduction

Les réactions enzymatiques à un seul substrat sont rares. Les enzymes catalysent des réactions entre 2 ou 3 substrats. Dans les réactions à deux substrats, il peut y avoir ou non la formation d'un complexe ternaire entre l'enzyme et les deux substrats, suivant le chemin réactionnel. La plus part des réactions à deux substrats peuvent être classées dans un des deux cadres suivants :

- Réactions à simple déplacement -
  Réactions à double déplacement

Soit la réaction générale :

$$\mathbf{A + B \rightleftharpoons P + Q}$$

1. Approche expérimentale

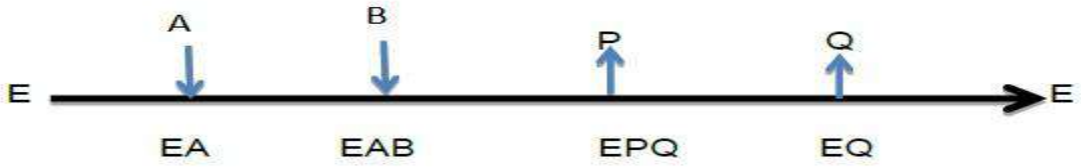
L'étude des réactions enzymatiques à 2 substrats consiste à déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes d'affinité de chacun d'eux en présence ou en absence de l'autre et la vitesse maximale de la réaction, lorsque les 2 substrats sont en concentrations saturantes.

1.1. Première étape :

On effectue l'expérience avec le premier substrat(A) en excès, on l'appelle le substrat fixe et on mesure la vitesse en faisant varier B (substrat variable) et ceci en phase stationnaire

1.2. Deuxième étape :

On prend B en excès et on fait varié A pour mesurer les vitesses en phase stationnaire. Les deux étapes (cinétiques) sont de type Michaelien, mais le traitement mathématique est complexe et c'est pourquoi on utilise **la notation de Cheland (1963)**. On symbolise la réaction enzymatique à l'aide d'un trait horizontale, alors que les flèches symbolisent les substrats et les produits au cours du cycle de la réaction.



2. Réactions à simple déplacement :

Elles impliquent la formation d'un complexe ternaire et les conditions expérimentales dans ces réactions sont :

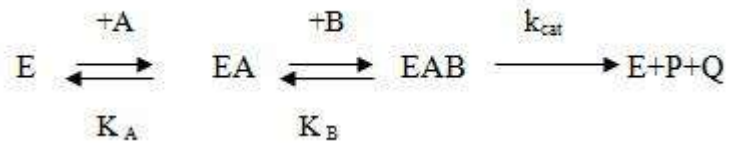
La réaction réverse est négligée : **A + B** $\longrightarrow$ **P + Q**

- Les deux substrats A et B doivent être présents simultanément
- L'association des substrats à l'enzyme peut suivant les systèmes s'effectuée de manière différente.

On distingue deux types d'association des substrats à l'enzyme :

2.1. Mécanisme ordonné (séquencé)

Dans ce mécanisme un substrat se fixe nécessairement le premier sur l'enzyme pour que la fixation du second soit possible, soit la réaction suivante :



K_A et K_B sont les constantes d'équilibre des deux étapes :

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

Quand on fixe A et on fait varier B, on obtient l'équation de vitesse :

$$\boldsymbol{v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A . K_B}{[A][B]}}}$$

<u>Représentations graphiques</u>

[A] = cte

$$\boldsymbol{\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} . \frac{1}{[B]} \left(K_B + \frac{K_A}{[A]} . K_B \right) + \frac{1}{V_{max}}}$$

Les droites de la représentation primaire de 1/V = f (1/[B]) se coupent sur l'axe des ordonnées. Du moment que B ne se fixe que sur le complexe EA, sa présence en excès déplace l'équilibre entre E et A vers les formes complexées et tout l'enzyme est alors sous la forme EA-B; on mesure ainsi la vitesse maximale (**Figure. 1)**.

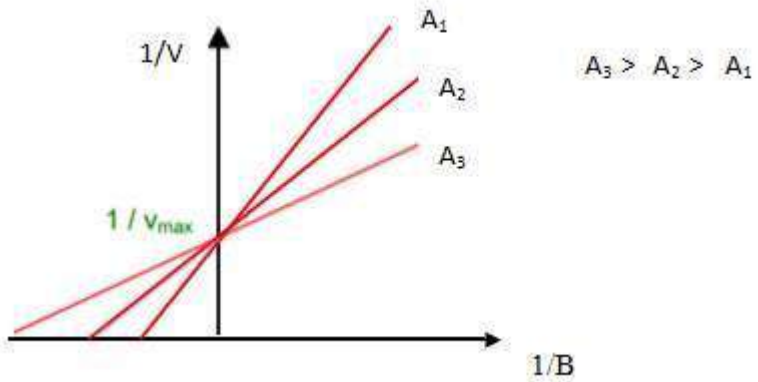


Figure 1. Représentation Primaire : 1/V = *f* (1/B)

On met : [B] = Cte et la représentation graphique se fait en fonction de A (Figure.2)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left[\frac{K_A K_B}{[B]}\right] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

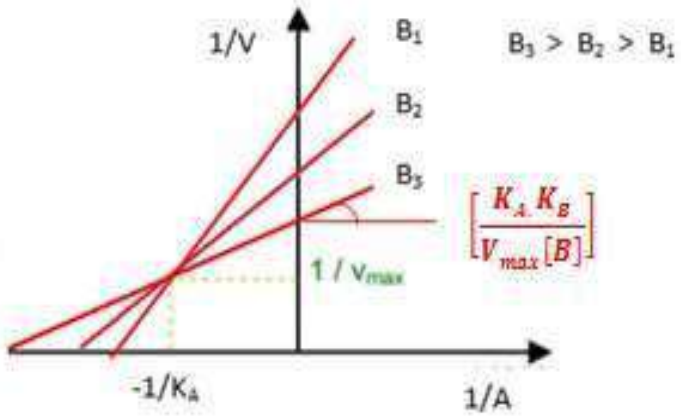
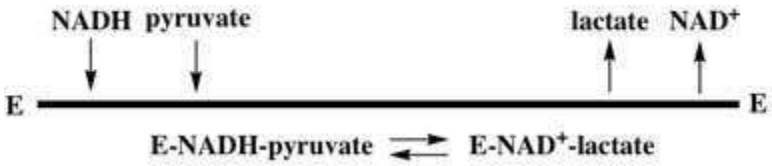


Figure2. Représentation Primaire : 1/V = *f* (1/A)

Exemple de mécanisme ordonné ou séquencé (Les déshydrogénases à NAD^+)

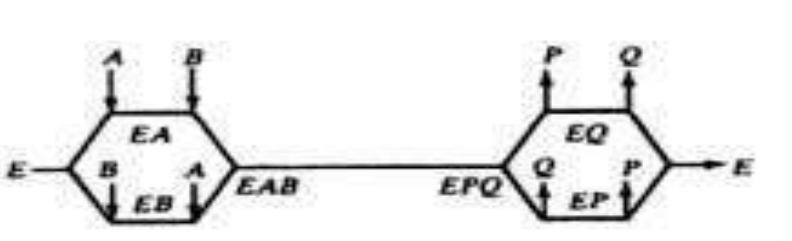
- **Cas de lactate déshydrogénase (Mécanisme à simple déplacement):** Certains enzymes nécessitent la présence d'un coenzyme dissociable, pour l'analyse le coenzyme peut être considéré comme un second substrat.



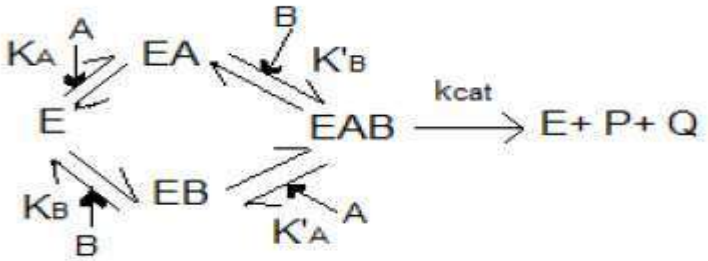
2.2. Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire)

Les 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). La réaction implique l'existence de quatre constantes d'équilibre K_A, K_B, K'_A et K'_B. Dans ce mécanisme, la fixation des deux substrats peut être soit dépendante ou indépendante. Dans le premier cas, le plus fréquent, l'association de A et B à l'enzyme dépend l'une de l'autre alors que dans le second cas, l'association de A et B à l'enzyme est indépendante.

Représentation de Cleland :



2.2.1. Association dépendante : C'est-à-dire que la fixation de A modifie l'affinité de l'enzyme pour B et réciproquement



$$v = k[EAB]$$

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K'_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} \qquad K'_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

K_A : constante de dissociation de EA ; K_B : constante de dissociation de EB

K'_A : constante de dissociation de EAB ; K'_B : constante de dissociation de EAB

Pour chaque concentration de A ou de B, la vitesse en fonction de A ou de B suit la loi de Michaelis et la vitesse maximale est obtenue lorsque l'enzyme est saturé en A et en B:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]}\right)$$

Représentations graphiques :

a) $[A] = Cste \qquad \frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[B]}\right)$ permet de tracer la figure 3.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[B]}\left(\frac{K'_B}{V_{max}} + \frac{K_A K'_B}{[A]V_{max}}\right) + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K'_A}{[A]}\right)$$

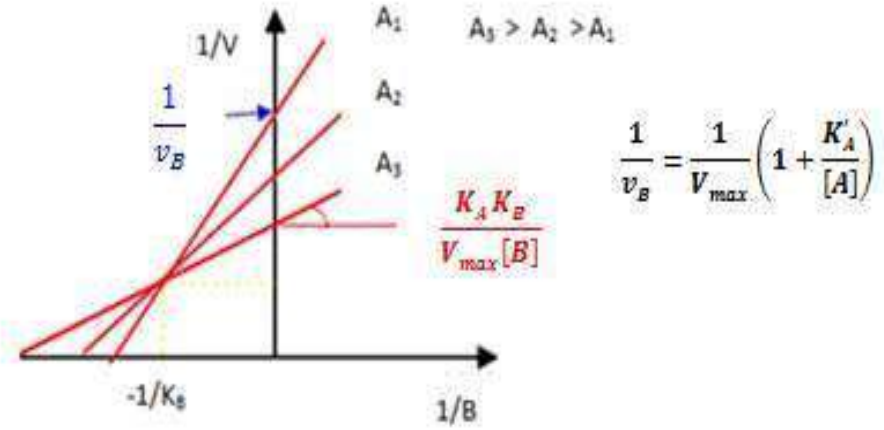


Figure 3. Représentation Primaire : 1/V = *f* (1/B)

Quand on prend [B]= constante, on trace la représentation primaire **1/v*f* (1/A)**

- Les graphes primaires permettent de déterminer de nouvelles valeurs : <u>voir les équations des droites</u>.

- Ces valeurs sont reportées dans le graphe secondaire pour le substrat A (**Figure 4**) et le graphe secondaire pour le substrat B.
- Elles permettent de déterminer les paramètres cinétiques

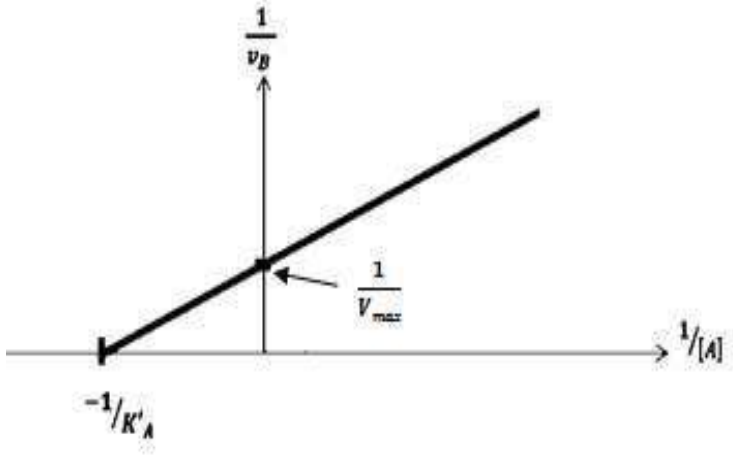


Figure 4. Représentation secondaire 1/ V $_B$ *f* (1/A)

Deux cas se présentent :

- Premier cas : Lorsque l'ordonné est positif par rapport au point d'intersection :
  - Si $K'_A < K_A$, la fixation de B augmente l'affinité de EB pour A
  - Si $K'_B < K_B$, la fixation de A augmente l'affinité de EA pour B

  Et donc on obtient une fixation **dépendante positive** car la fixation du premier substrat facilite la fixation du second substrat.

- Deuxième cas : Lorsque l'ordonné est négatif par rapport au point d'intersection :
  - Si $K'_A > K_A$, la fixation de B diminue l'affinité de EB pour A ○

  Si $K'_B > K_B$, la fixation de A diminue l'affinité de EA pour B

2.2.2. Association indépendante :

Dans le cas d'une fixation indépendante : $K_A = K'_A$ et $K_B = K'_B$

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}\right)$$

$\frac{1}{v}$ *en fonction de* $\left(\frac{1}{A}\right)$: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]}\left(K_A + \frac{K_A K_B}{[B]}\right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{K_B}{[B]} + \frac{1}{V_{max}}$**(Figure 5)**

$\frac{1}{v}$ *en fonction de* $\left(\frac{1}{B}\right)$: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[B]}\left(K_B + \frac{K_A}{[A]}\right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{K_A}{[A]} + \frac{1}{V_{max}}$**(Figure 7)**

Représentations graphiques :

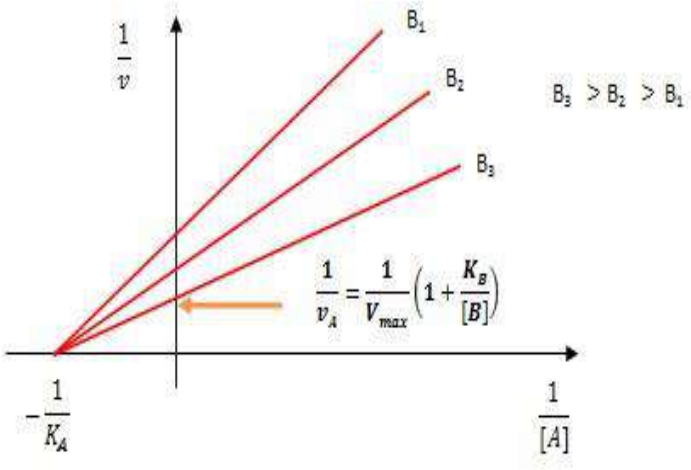


Figure 5. Représentation Primaire : 1/v *f* (1/A)

Une représentation secondaire **(Figure 6)** est effectuée depuis les points d'intersection avec l'axe des ordonnées dans la figure 5 et permet de tracer le graphe selon l'équation :

$$\frac{1}{v_A} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]}\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

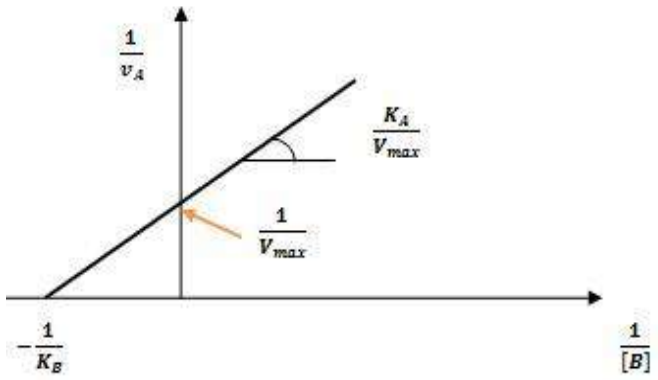


Figure 6. Représentation secondaire **1/vA *f* (1/B)**

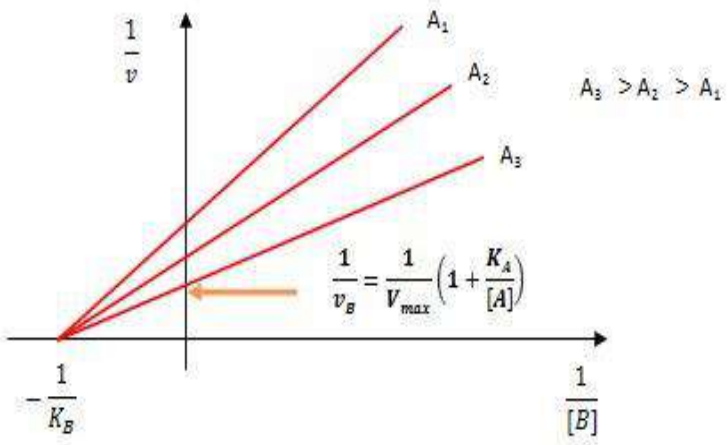
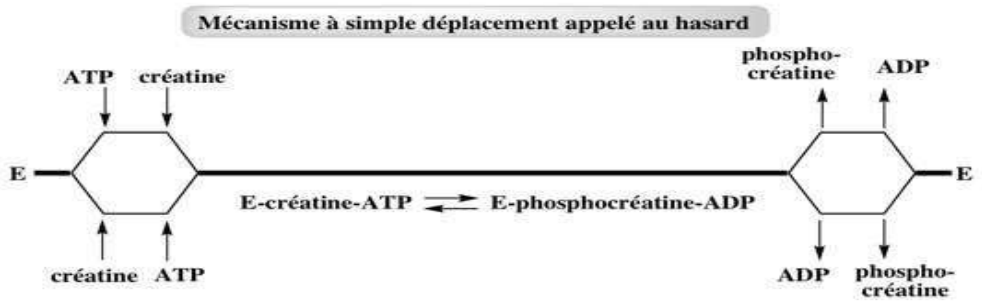


Figure 7. Représentation primaire **1/v *f* (1/B)**

Exemple d'enzymes

- la créatine kinase (E.C. 2.7.3.2). Il s'agit d'un mécanisme Bi Bi au hasard.

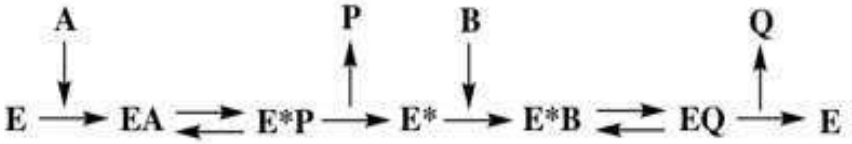


3. Réactions à double déplacements impliquant la formation d'un complexe binaire

Certaines réactions du métabolisme impliquant deux substrats se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire. C'est le cas de beaucoup de réaction de transfert de groupes qui mettent en jeu que la formation de complexes binaires.

3.1. Mécanisme Pin-Pong (appartient aux réactions ordonnées)

C'est un mécanisme séquencé, l'enzyme se complexe d'abord avec ce 1er substrat qui subit une première transformation avec libération du premier produit (P) puis elle s'effectue la 2^{éme} association de l'enzyme avec le second substrat et le complexe formé est toujours binaire. Le second produit et l'enzyme sont libérés.



Si on considéré uniquement la réaction dans le **sens de gauche à droite** et on se place dans les conditions initiales qui permettent de négliger la réaction inverse, on aboutit à l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$\frac{1}{v}$ $en\ fonction\ de\left(\frac{1}{A}\right)$: Figure 8

$\frac{1}{v}$ $en\ fonction\ de\left(\frac{1}{B}\right)$: Figure 9

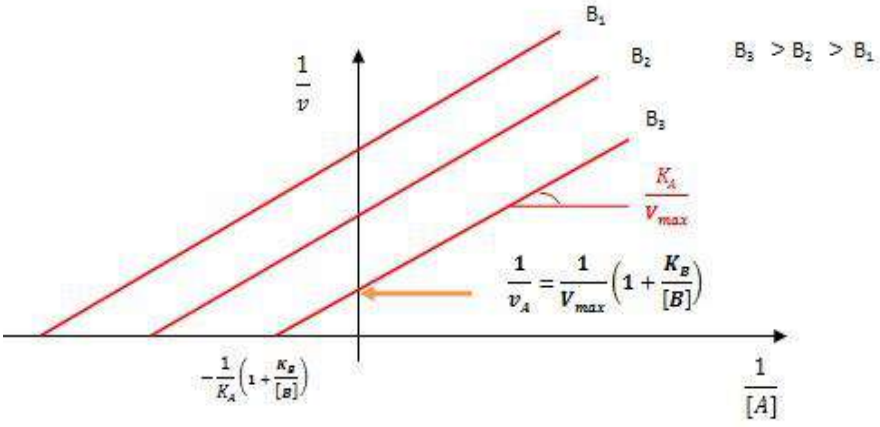


Figure 8. Représentation primaire **1/v *f* (1/A)**

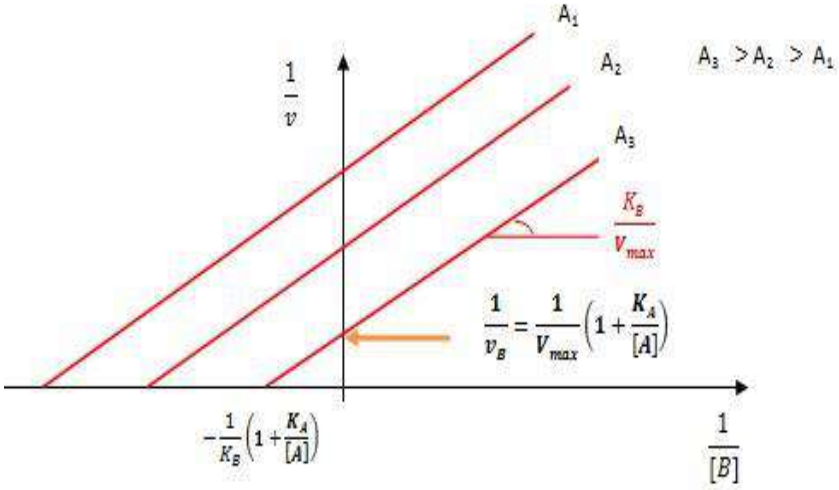


Figure 9. Représentation primaire **1/v *f* (1/B)**

Si on porte **1/vA =*f* (1/B)**, on obtient la représentation secondaire **(Figure 10)**, celle-ci permet de mesurer : V_{max} et K_B

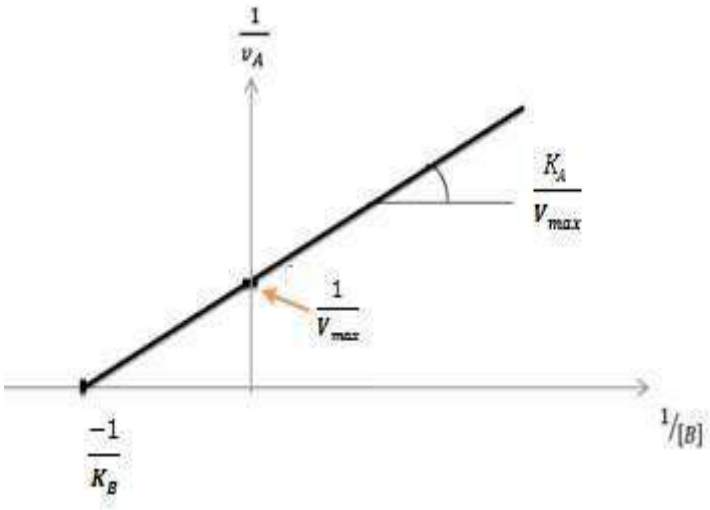
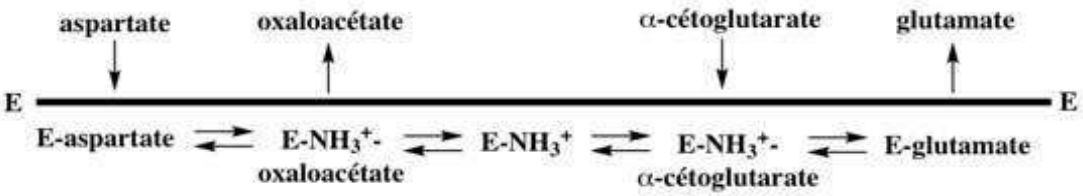


Figure 10. Représentation secondaire **1/v_A *f* (1/B)**

Exemple d'enzyme

- les <u>aminotransférases</u> : mécanisme Ping- Pong (figure ci-dessous)



Chapitre 5 : Effet du pH sur l'activité enzymatique

Introduction

Le H^+ est l'effecteur général de la réaction enzymatique. La concentration en H^+ détermine le pH du milieu. Ce dernier affecte les paramètres cinétiques des enzymes et les paramètres conformationnels des protéines qui sont très sensibles aux variations de pH.

Les mesures de nombreuses activités enzymatiques en fonction du pH donnent des courbes qui passent par un maximum montrant l'existence d'un pH optimum, donc pour beaucoup d'enzymes, le pH optimal a été déterminé.

Le pH peut avoir différents effets:

- L'ionisation des résidus de l'enzyme, du substrat et du produit
- La structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme
- La liaison du substrat à l'enzyme
- Un effet sur l'activité catalytique elle-même

1. Action du pH sur la conformation de l'enzyme

Les différents groupements chimiques ionisables qui sont présents dans une protéine peuvent être **protonés** ou **déprotonés** suivant le pH. Il est fréquent que les enzymes se dénaturent en milieu très acide ou au contraire très alcalin, cet effet entraine un changement de la structure tridimensionnelle et la perte de l'activité est due en partie à une variation de la charge globale.

L'action du pH (H^+ ou OH^+) entraine souvent une dénaturation réversible. Aux pH extrêmes, la dénaturation est irréversible. Le changement de structure lié au pH et entraînant la perte de l'activité catalytique est parfois dû à la protonation ou à la déprotonation d'un seul groupe de la protéine. C'est le cas de la trypsine où la structure active met en jeu une interaction électrostatique COO^- ….. NH_3^+.

2. Action du pH sur les paramètres cinétiques

Le pH a un effet sur les paramètres V_{max} et K_M de la réaction. Cela peut résulter de l'ionisation de l'enzyme ou du substrat ou les deux molécules.

Dans les études cinétiques, on ne tient pas compte de l'ionisation du substrat si elle existe, on tiendra compte seulement de l'ionisation de l'enzyme.

La plupart des effets de pH sur les réactions enzymatiques résultent d'un effet à la fois sur Vm et Km. Il semble seule une des formes ionique de l'enzyme ou d'une partie des formes ioniques de l'enzyme soit catalytiquement active c'est la forme EH **(Figure 1)**:

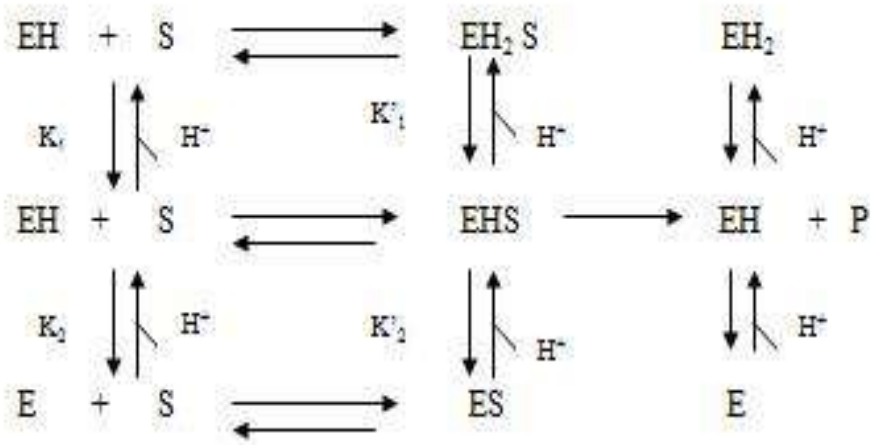


Figure1. Schéma simplifié où un seul complexe intermédiaire intervient (le complexe de Michelis EHS)

K_1 : Constante de protonation de l'enzyme libre

K_2 : Constante de déprotonation de l'enzyme libre K'_1

: Constante de protonation du complexe ES

K'_2 : Constante de déprotonation du complexe ES

K_1, K_2, K'_1 et K'_2 représentent les différentes constantes d'ionisation de l'enzyme libre et du complexe de Michaelis. Seule la forme EHS donne le produit.

Equation de vitesse

La vitesse est proportionnelle à la quantité du complexe intermédiaire. Pour étudier le comportement catalytique d'une enzyme en fonction du pH, nous travaillons avec une concentration saturante en substrat, on mesure donc V_{max} apparent. C'est un V_{max} mais qui n'est qu'apparent : c'est la vitesse la plus grande mesurable. V_{max} est donnée par l'équation suivante :

$$V_{max(pH)} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_1} + \frac{K'_2}{[H^+]}}$$

2.1. Effet du pH sur V_{max} : ($V_{max}=f$(pH))

L'étude des variations de $V_{max\,(pH)}$ permet de déterminer K'_1 et K'_2, la méthode utilisée est celle de DIXON (log $V_{max\,(pH)}$ en fonction du pH, pH = log $[H^+]$). La courbe expérimentale est tangente à trois segments de droites, de pentes respectives +1, 0, -1 **(Figure 2).**

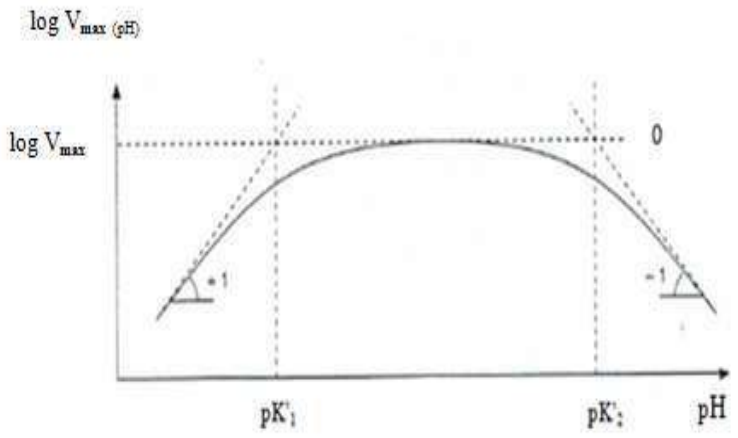


Figure2. Représentation graphique de log V_{max} en fonction du pH

Si pK'_1 et pK'_2 sont suffisamment séparés, les intersections de ces trois segments de droites permettent de définir pK'_1 et pK'_2. V_{max} dépend de l'ionisation du complexe de Michaelis.

L'intérêt de la méthode de Dixon est qu'elle permet de déterminer aux pH extrêmes, le nombre de groupes dont la protonation ou la déprotonation entraine une perte de l'activité enzymayique.

2.2. Effet du pH sur K_M ($K_M = f$(pH))

La valeur du $\mathbf{K_M}$ en fonction du pH présente une variation plus complexe, car elle dépend à la fois des pK d'ionisation des groupes dans l'enzyme libre (pK_1, pK_2) et dans le complexe de Michelis (pK'_1, pK'_2). Les paramètres cinétiques sont donnés par l'équation suivante :

$$K_{M(pH)} = K_M \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_1} + \frac{K'_2}{[H^+]}}$$

pK= log K_M , si pK_1 et pK'_1 sont suffisamment séparés de pK_2 et pK'_2, l'expression de $K_{M(pH)}$ se simplifie en milieu acide comme en milieu alcalin **(Figure 3)** :

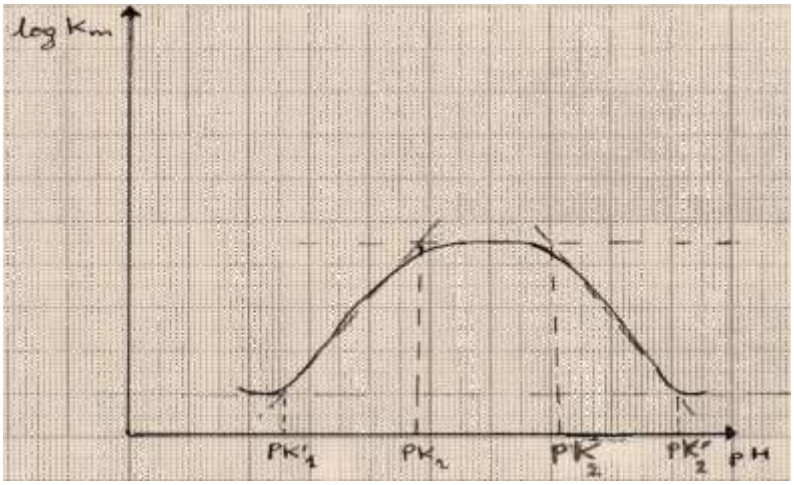


Figure3. Représentation graphique de log K_M en fonction du pH

2. 3. Effet du pH sur le rapport (V_{max}/K_M)

$(V_{max}/K_M)_{pH}$ dépendent que de l'ionisation de l'enzyme libre et la courbe de (V_{max}/K_M) en fonction du pH est représentée dans la figure 4 et l'équation est comme suit :

$$\frac{V_{max(pH)}}{K_{M(pH)}} = \frac{V_{max}}{K_M} \times \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$$

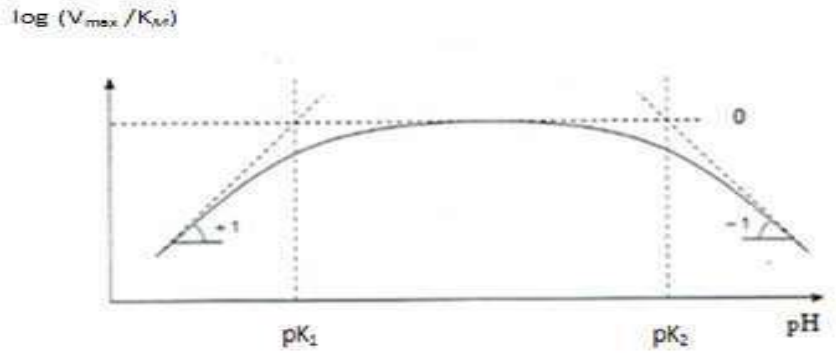


Figure4. Représentation graphique de log V_{max}/K_M en fonction du pH

Chapitre 6 : Enzymes allostériques

(Régulation enzymatique)

Introduction

Lorsqu'une protéine possède plusieurs sites de fixation pour un ligand, la saturation par ce ligand peut être Michaelienne ou non. Un comportement Michaelien est obtenu lorsque les sites sont équivalents et indépendants ; la courbe de la vitesse v en fonction de la concentration en substrat S suit alors une loi hyperbolique. Les enzymes allostériques ne suivent pas la cinétique classique de Michaélis, la courbe v=f(S) n'est pas hyperbolique mais sigmoïde **(Figure1).** Ces enzymes jouent un rôle important dans la régulation métabolique ; ce sont des enzymes-clés. Les sites de régulation allostérique sont des sites de liaison distincts du site actif (site catalytique) qui peuvent interagir avec des molécules de l'environnement cellulaire, appelées dans ce cas effecteurs allostériques. (allostérie = autre structure)

allos provient du grec et signifie « autre » : autre site qui fixe un ligand allostérique capable de moduler la vitesse de la réaction

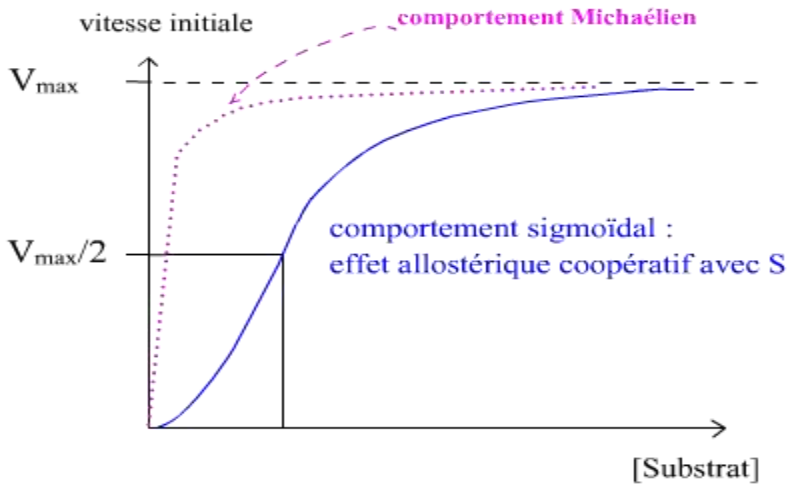


Figure1. Courbe $v=f\ [S]$ avec un comportement Michalien pour l'un et allostérique pour l'autre

1. Propriétés d'autorégulation des systèmes enzymatiques

Certains systèmes multi-enzymatiques possèdent la capacité d'autorégulation. Dans la régulation allostérique, un métabolite de la voie réactionnelle peut se fixer de façon noncovalente à l'enzyme et ainsi moduler son activité catalytique. Ainsi, dans ces systèmes multienzymatiques, le produit final de la chaîne de réactions sert d'inhibiteur spécifique à une enzyme du début de la chaîne. La rétro inhibition (feedback négatif ou inhibition par le produit final) a été mise en évidence dans de nombreux systèmes poly enzymatiques où le produit final de la réaction peut inhiber spécifiquement un enzyme se trouvant au début de la séquence réactionnelle. Tel que l'exemple dans les séquences réactionnelles de synthèse d'un aminoacide, l'isoleucine à partir de la thréonine. La première étape de la séquence réactionnelle est appelée étape déclenchante car une fois qu'elle a lieu toutes les autres se réalisent. La **rétro inhibition** est donc un phénomène d'inhibition spécifique d'un enzyme placé en début de séquence métabolique, par le produit final de séquence réactionnelle. Ce type d'enzyme inhibé par le produit final de la réaction est appelé : **enzyme allostérique.**

Exemple de la conversion de la L-thréonine en iso-leucine qui se fait en 5étapes

L-thréonine

↓ E_1

α-céto-butyrate

↓ E_2

α-céto-hydroxy-butyrate

↓ E_3

α, β dihydroxy-méthyl valérate

↓ E_4

α-céto-méthyl-valérate

↓ E_5

L-iso-leucine iso-leucine

E_1 est la thréonine désaminase ; L-iso-leucine agit selon un ***Feed back*** ou par **rétroinhibition.** Dans l'exemple, E_1 qui est le premier enzyme dans le « système enzymatique autorégulé » est inhibé par le produit final (L-iso-leucine) du système enzymatique : E_1 est un **régulateur** ou **enzyme allostérique** et l'inhibiteur est un **modulateur** ou **effecteur**, dans ce cas il est négatif.

2. Propriétés et classification des enzymes de régulation

2.1. Propriétés

Les enzymes de régulation appelés aussi enzymes allostériques (terme proposé par Monod, et Changeux) possèdent un poids moléculaire élevé et sont complexes et donc plus difficiles à purifier que les autres enzymes. Ils ont souvent des propriétés inhabituelles : certains sont instables à O° et stables à température ambiante. Tous les enzymes de régulation connus possèdent plus d'une chaine polypeptidique, parfois plusieurs qu'on appelle aussi les **sousunités**

2.2. Classification

D'après Monod Wyman et Changeux (1965), on distingue 3 groupes d'enzymes de régulation

1. Enzyme homotropiques : Le substrat dans ce groupe joue également le rôle de modulateur, il accélère l'activité enzymatique
2. Enzyme hétérotropiques : Ces enzymes sont stimulés ou inhibés par des substances de régulation inhabituelles et différentes du substrat, il s'agit d'effecteurs
3. Enzyme homo-hétérotropique : Dans ce groupe, les enzymes ont pour effecteurs le substrat et d'autres molécules

3. Cinétique des enzymes de régulation

3.1. Paramètres cinétique s et actions des modulateurs

Soit la cinétique en absence et en présence d'effecteurs (modulateurs) **(Figure2)**, on obtient les courbes suivantes :

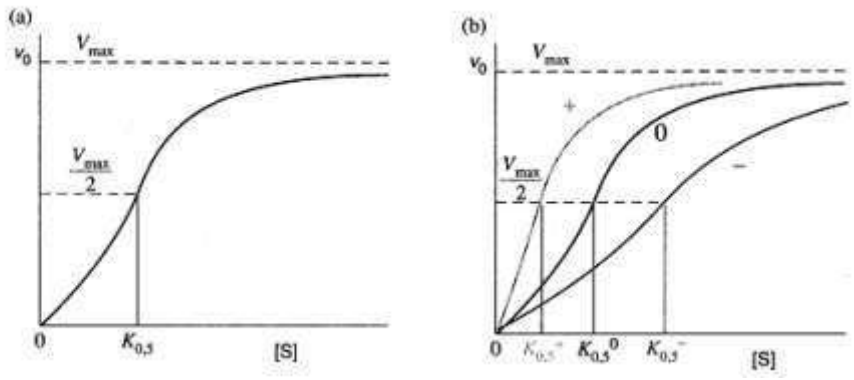


figure2. Courbes en absence et en présence des modulateurs où dans les cas :

(a) : Courbe sigmoïdale donnée par un enzyme allostérique pour lequel le substrat sert également de modulateur positif (activateur). K_M est la concentration de substrat donnant la demi-vitesse maximale. Une augmentation relativement faible de la concentration du substrat augmente une forte augmentation de la vitesse de la réaction.

(b) : Les effets d'un modulateur (+), d'un modulateur inhibiteur (-) et d'absence de modulateurs sur un enzyme allostérique

Les enzymes soumis à ce type de contrôle d'activité présentent des caractéristiques communes :

- La relation entre l'activité enzymatique et la concentration du substrat et la concentration d'un effecteur n'est pas de type hyperbolique. Le contrôle de type allostérique donne des courbes sigmoïdes.
- Ces enzymes peuvent être inhibés ou activés par des métabolites autres que les substrats ou leurs analogues.
- La coopérativité au niveau de la courbe montre que la liaison d'une molécule de substrat facilite relativement la fixation de la seconde.
- Des interactions coopératives sont également observées dans la fixation d'effecteurs allostériques, ce qui suggère que les enzymes allostériques renferment plus qu'un site allostérique par molécule.

3.2. Désensibilisation

La capacité des enzymes de régulation d'être activés ou inhibés par des modulateurs spécifiques peut disparaître sans altérer l'activité catalytique. Ceci est obtenu après traitement de l'enzyme par un agent chimique ou thermique, ce qui entraîne des modifications du site de l'effecteur. L'enzyme est dite désensibilisée, parfois de manière irréversible. Seul, le site allostérique est détruit ; il en résulte une perte du phénomène de coopérativité et la cinétique devient hyperbolique.

La désensibilisation est dans certains cas provoquée par une mutation génétique ; celle-ci entraîne alors la synthèse d'un enzyme ayant perdu la sensibilité à l'effecteur.

Exemple : L'ATCase possède deux substrats catalytiques (l'aspartate ou S_1 et le carbamoylP ou S_2) et deux effecteurs (l'ATP ou F_1 comme activateur et le CTP ou F_2 comme inhibiteur).

La réaction catalysée par l'**ATCase** appartient à la voie de synthèse des pyrimidines, c'est la première étape dans la cascade de synthèse du nucléotide CTP **(Figure 3):**

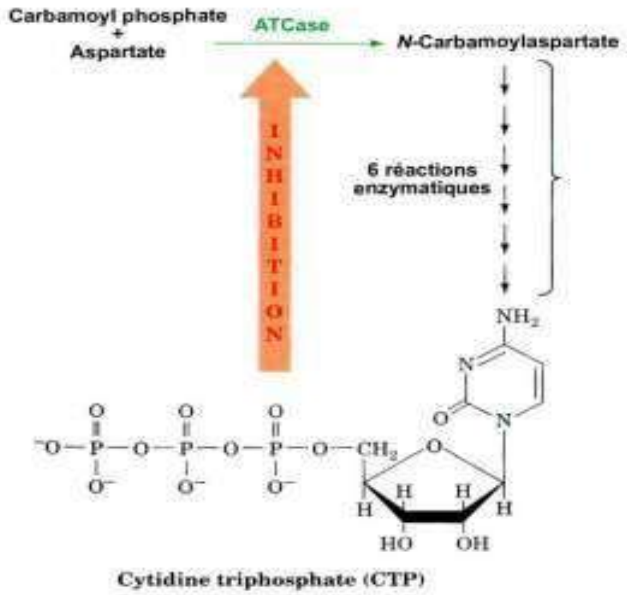


Figure. 3 Schéma illustrant la synthèse du nucléotide CTP

Une régulation allostérique (rétro-inhibition) par le nucléotide CTP. Le CTP réduit le taux de catalyse. Les activités de l'ATCase en présence et en absence d'effecteurs puis après l'action du *para*-chloromercuribenzoate (*p*CMB) donnent les courbes suivantes **(Figure 4)**:

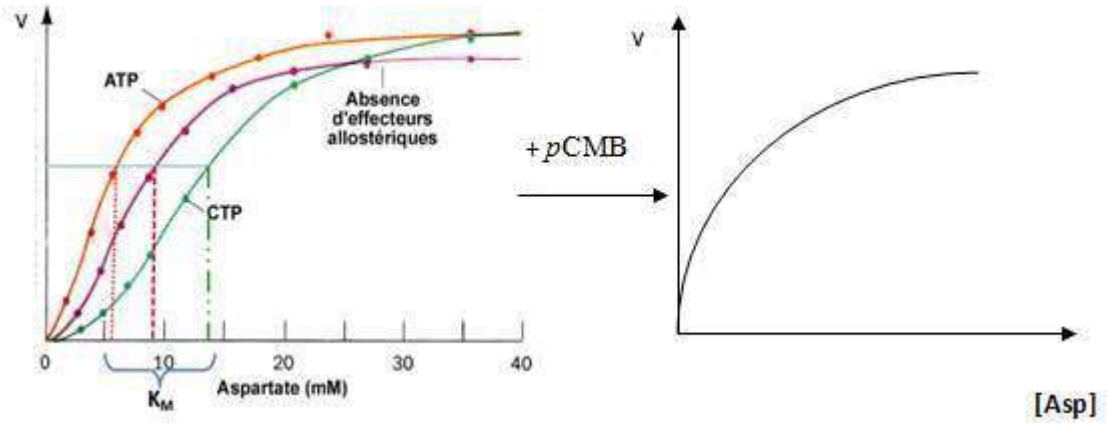


Figure4. L'ATCase en présence et en absence d'effecteurs puis après l'action du (*p*CMB)

Les effecteurs peuvent entraîner à la fois le changement de K_M et de V_{max}. L'action du *p*CMB sur l'ATPase entraîne la fixation du mercure sur les cystéines de l'enzyme et donc sa dénaturation, d'où le comportement michaelien. On constate également que le CTP et l'ATP n'agissent plus sur l'enzyme.

3.3. Coopérativité

La coopérativité traduit le fait que la fixation sur l'enzyme d'une molécule d'un effecteur allostérique (exemples: activateur allostérique (A) et inhibiteur allostérique (I)) influe sur la fixation des molécules suivantes.

Dans le cas de coopérativité en présence du substrat (sigmoïde de $v=f(S)$, Si l'effecteur allostérique est le substrat lui-même on parle de **modulation homotrope**.

Si l'effecteur est différent du substrat on parle de **modulation hétérotrope**. Dans une **coopérativité positive**, une molécule d'un effecteur entraîne l'augmentation de l'affinité pour les mêmes molécules et vice versa pour une **coopérativité négative**.

Les enzymes allostériques sont des oligomères ayant un axe de symétrie ; le nombre des unités étant un nombre pair. La coopérativité exprime l'interaction entre les unités. Celle-ci peut être positive ou négative

La coopérativité positive : lorsque l'amorce d'un phénomène **accélère** la suite

La coopérativité négative : lorsque l'amorce d'un phénomène **décélère** la suite

3.3.1. Nombre de Hill

Pour mesurer la cinétique, on ne peut plus utiliser l'équation de Michaélis-Menten, aussi on utilise la formule empirique que Hill a déterminée lors des études sur l'hémoglobine en 1910. Cette équation exprime la fraction des sites occupés en fonction de la concentration en substrats. Elle permet de déterminer le type de coopérativité au niveau de la liaison E-S.

Equation de Hills: sites liés / sites totaux = **[ES] / [Et] = $[S]^n$ / (K + $[S]^n$)** où **n** et **K** sont des constantes. Pour faire une analogie avec l'équation de Michaélis-Menten, on utilise le fait que $v_i = k_{cat}[ES]$.

Donc le nombre de Hill exprime la coopérativité d'une enzyme allostérique. Il est calculé à partir de la transformée de Hill qui s'écrit comme suit :

$$\log \frac{v_i}{V_{max} - v_i} = \mathrm{n}.\log \mathrm{S} - \log K_M$$

La transformée de Hill permet de tracer la courbe de $\log \frac{v_i}{V_{max}-v_i}$ en fonction de S **(Figure 5)** et donc de calculer **n** et $\mathbf{K_M}$

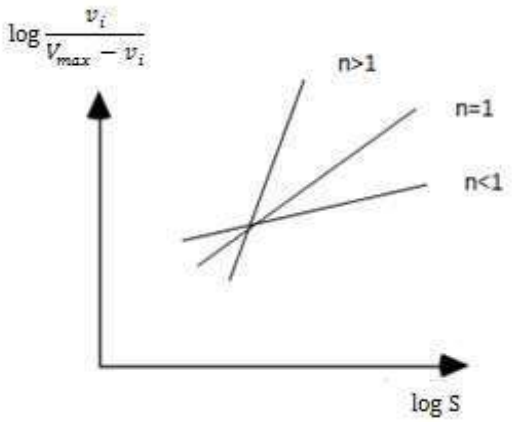


Figure5. La représentation de la transformée de Hill

L'intérêt de ce graphique est de permettre de déterminer le type de coopération grâce à la pente n

- si n = 1, la coopérativité est nulle, la cinétique de l'enzyme est michaélienne

- si n > 1, la coopérativité est positive ; dans ce cas 1< n< N (N étant le nombre de sousunités)

- si n < 1, la coopérativité est négative.

4. Mécanisme de régulation

La question que l'on peut se poser est « comment la fixation d'un modulateur sur le site spécifique régule l'activité catalytique lorsque le site de fixation du modulateur est éloigné du site catalytique et peut être situé sur une autre chaîne polypeptidique ? ».

Plusieurs théories ont été développées, toutes ont aboutis à la conclusion suivante :

La fixation d'un modulateur (effecteur) sur son site de fixation entraîne un changement conformationnel de la structure tridimensionnelle de la molécule enzymatique.

4.1. Théorie de MONOD-WYMAN et CHANGEUX (MWC)

4.1.1. Formes R et T

L'enzyme existe sous deux formes R_0 et T_0 en équilibre. Lorsque E est sous l'une des deux formes, les sites de fixation du ligand sont équivalents et indépendants. **La cinétique de fixation est michaélienne.**

Si un ligand a plus d'affinité pour une des deux formes (exp R), il se fixe de préférence sur R ; la concentration de R_0 diminue alors que celle de R_1 augmente. Cela entraîne un déplacement de l'équilibre de T_0 vers R_0 pour le maintenir à son état initial. Donc les formes R augmentent, d'où la coopérativité qui intervient lors de la fixation de ligand. Lorsque l'équilibre est presque **entièrement déplacé vers R**, les sites deviennent équivalents et indépendants ; **l'enzyme se comporte alors de façon michaélienne.**

4.1.2. Modèles K et V

- **Le modèle K** : suppose que le substrat présente plus d'affinité pour une des deux formes que pour l'autre (par définition R), les K_M des deux formes sont différents
- **Le modèle V** : suppose que le substrat possède la même affinité pour les deux formes R et T. S ne se comporte plus comme un effecteur allostérique. La cinétique est michaélienne. Les propriétés allostériques de l'enzyme sont mises en évidence par l'addition d'effecteurs allostériques.

4.1.3. Développement théorique

La transition allostérique modifie les forces de liaisons qui associent les sous-unités entre elles sans aller à l'état de dissociation. La molécule entière se trouve soit dans un état contraint (**T**) soit dans un état relâché (**R**).

Deux modèles rendent compte de la transition que présentent les enzymes allostérique au moment de la fixation du substrat : le model **concerté** (ou symétrique) (élaboré par Monod, Wyman et Changeux en 1965) et le model **séquentiel** (élaboré par Koshland en 1966). Ces deux modèles impliquent que l'enzyme existe sous plusieurs conformations dont deux extrêmes : T (*tense*) et R (*relaxed*). Ce dernier a pour le substrat une affinité plus marquée que T. Les deux formes existent en équilibre.

$$T \rightleftharpoons R$$

- Dans le modèle concerté, la transition se fait en un seul bloc. Elle concerne simultanément toutes les sous-unités **(Figure 6)**. Toutes les sous-unités d'un enzyme doivent conserver la symétrie moléculaire, et, par conséquent, elles sont toutes en même temps au même état T ou R, à un moment précis. L'enzyme global existe donc sous forme T ou R, puisque c'est seulement dans cette configuration qu'il y a la conservation de symétrie par toutes les sousunités. Ainsi, la fixation du substrat dans un premier site actif provoque une transition telle que toutes les sous-unités de l'enzyme deviennent sous forme R, et ceci représente l'état de compétence catalytique. L'effecteur se lie à l'état T ou R de préférence et ainsi exerçant son rôle d'inhibiteur ou d'activateur.

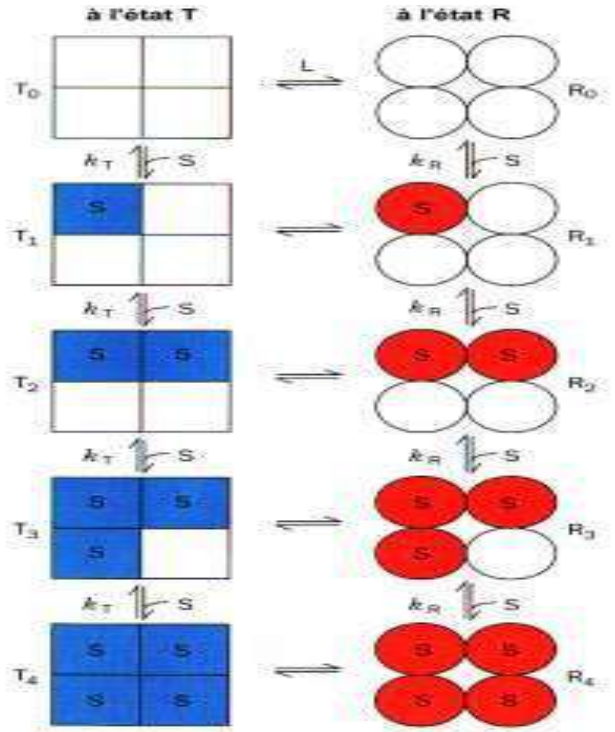


Figure 6. Transition en un seul bloc

-Dans le modèle séquentiel (**Figure 7)**, la transition se fait sous-unités par sous-unités.

Chaque sous-unité a la possibilité d'être sous forme R ou T, indépendamment des autres sousunités. L'enzyme est constitué d'un mélange de sous-unités sous forme T et R. La liaison d'un premier substrat change la structure de la sous-unité à laquelle il s'est fixé (R), alors que les autres sous unités acquièrent une affinité intermédiaire entre celle observée à l'état T et celles à l'état R. La liaison du ligand induit donc progressivement des changements conformationnels dans les sous-unités, les changements les plus importants se produisant au niveau des sous-unités qui ont lié le ligand. Le couplage entre les sous-unités n'est pas nécessairement assez fort pour préserver la symétrie de l'oligomère comme c'est le cas dans le modèle symétrique.

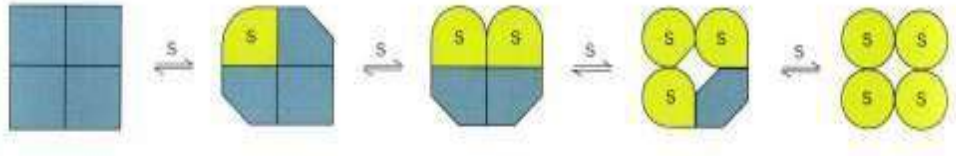


Figure 7. Transition sous-unités par sous-unités

4.1.4. Modèle de l'hémoglobine :

L'hémoglobine est formée par l'association de 4 sous-unités protéiques : 2 sous-unités dites α et 2 sous-unités dites β. La structure peut ainsi s'écrire $\alpha_2\beta_2$. Associée à chaque chaîne α ou β, on trouve une structure non protéique appelée hème. Chaque hème (4 au total, identiques) portant en son centre un ion Fe^{2+}. Ainsi, l'hémoglobine est une hétéroprotéine. L'hème est enchâssé dans un repli hydrophobe tout juste accessible à l'O_2.

A l'état libre, la conformation de Hb $\alpha_2\beta_2$ est ainsi faite que le site pour l'O_2 de chacune des 2 chaînes β est inaccessible. Les chaînes α présentent en revanche un accès à l'O_2.
Même s'il est très étroit cet accès existe : l'affinité pour l'O_2 pour les chaînes α est faible.

Si une première molécule d'O_2 se fixe sur une chaîne α, elle va induire un mouvement conformationnel global, comme on l'a vu ci-dessus. Et en fait ce mouvement va se répercuter essentiellement sur la deuxième chaîne α qui va voir son affinité pour O_2 fortement augmentée. Quand les 2 chaînes α ont lié chacune un O_2, l'induction de changement conformationnel fait passer les 2 chaînes β en conformation à très haute affinité pour O_2. L'Hb se sature alors en O_2

D'où l'énoncé : O_2 exerce un effet coopératif positif sur sa propre fixation (l'affinité s'améliore avec la première fixation). La courbe sigmoïde de saturation est une conséquence directe de ce phénomène.

La figure 8 montre la fonction de saturation de l'hémoglobine. Elle est comparée à celle de la myoglobine. La myoglobine est une protéine des cellules musculaires. Elle leur assure un stockage de dioxygène. La myoglobine est monomérique, formée par une chaîne polypeptidique de structure très voisine de celles des chaînes α et β de l'hémoglobine et cette chaîne polypeptidique est associée à un hème. La myoglobine lie évidemment le dioxygène.

Pour l'hémoglobine (Hb): 100% de saturation signifie 4 O_2 par Hb $\alpha_2\beta_2$. Pour la myoglobine (Mb) : 100% de saturation signifie 1 O_2 pour une Mb.

La courbe de saturation de Mb est une hyperbole classique. La courbe de saturation de Hb possède **une allure sigmoïde**. Cette allure est **due à un effet coopératif.**

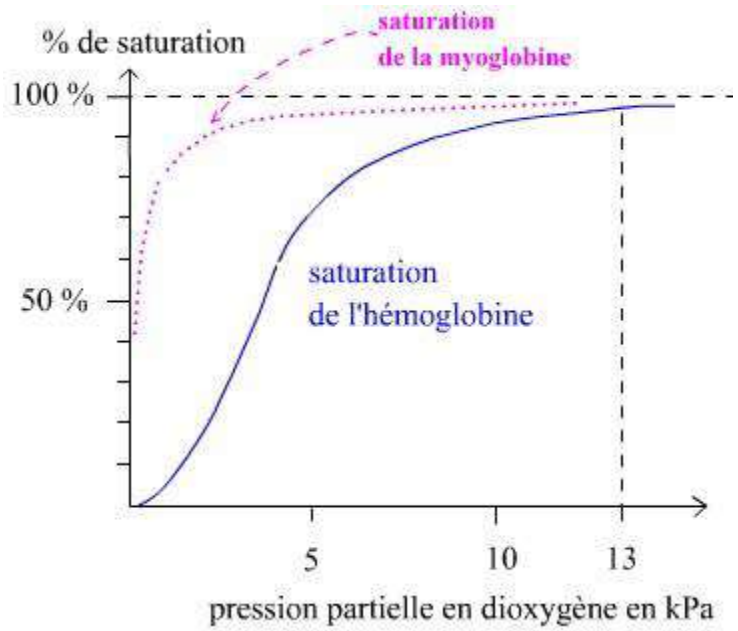


Figure 8. La fonction de saturation de l'hémoglobine et de la myoglobine

4.2. Sites catalytiques et sites de régulation

<u>Exemple de l'aspartate transcarbamylase (ATCase)</u>

L'existence de sites catalytiques et sites régulateurs est illustrée par l'exemple de **l'aspartate transcarbamylase (ATCase**) d'*E. coli*.

L'enzyme fixe S_1 et S_2 sur une sous-unité dite **catalytique**, présente en 6 exemplaires, (unités α). Il fixe les effecteurs sur une autre sous-unité dite **effectrice,** présente également en 6 exemplaires (unités β). L'enzyme comporte au total 12 unités ; il a pour formule $\alpha_6 \beta_6$, avec des MM^{aire} de 34000 pour l'unité α et 17000 pour l'unité β.

L'action des effecteurs modifie l'équilibre entre T et R :

- F_1 a plus d'affinité pour R ; il entraine le déplacement d'équilibre de T vers R.
- F_2 a plus d'affinité pour T ; il entraine le déplacement d'équilibre de R vers T.
- Une régulation positive par le nucléotide ATP, qui augmente le taux de catalyse. Il semble que l'ATP compétitionne avec le CTP pour se fixer au site modulateur. L'interaction allostérique change la conformation des sites de liaison du substrat. Selon la théorie de l'allostérie, chaque sous-unité catalytique peut exister sous une forme T (basse affinité pour le substrat) ou sous forme R (haute affinité pour les substrats.

Les deux états sont dus à une transition de la structure quaternaire de l'enzyme qui modifi la structure du site actif et ainsi change la capacité de liaison du substrat et sa catalyse. Les changements tertiaires (dans une sous-unité) et quaternaires (entre les sous-unités) manifestés ne sont pas indépendants; ils sont fortement couplés dû à des contacts étroits entre sousunités. L'état T et R représentent un équilibre contrôlé par la force de la liaison de chacun des ligands.

Références Bibliographiques

Baty F *et al.* (2015). *"A Toolbox for Nonlinear Regression in R: The Package nlstools". Journal of Statistical Software,* 66 (5)

Bugg T D H (2012). Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. third edition: WILEY. 290 p

Sine Jean-Pierre (2010). Enzymologie et applications. Edition Ellipses. 464 p

Aron W. Fenton (2008). Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life'; Trends Biochemical Sciences, 33(9): 420–425

Athel-cornish-bowden, Marc jamin, Valdur Saks. (2005). Cinétique enzymatique. Publié par EDP Sciences dans la collection Grenoble Science dirigée par Jean Bornarel. 462 p

Goudar CT et al. (2004)."*Progress curve analysis for enzyme and microbial kinetic reactions using explicit solutions based on the Lambert W function". Journal of Microbiol. Methods,* 59(3): 317 - 326

Schnell S & Mendoza C.(1997). "*A closed form solution for time-dependent enzyme kinetics". J. Theor. Biol,* 187 : 207–212

Jean Pelmont (1995). Enzymes catalyseurs du monde vivant. Publié par EDP Sciences dans la collection Grenoble Science 2éme édition. 1040 p

Segel, I. (1993). *"Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems".* Wiley classics Library Edition., New York

Lehninger A.L (1986). Principes de Biochimie (2ère édition)

Michaelis & Menten (1913) "*Die kinetic der invertinwirkung*" *Biochem. Z.* 49, 333 - 369

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