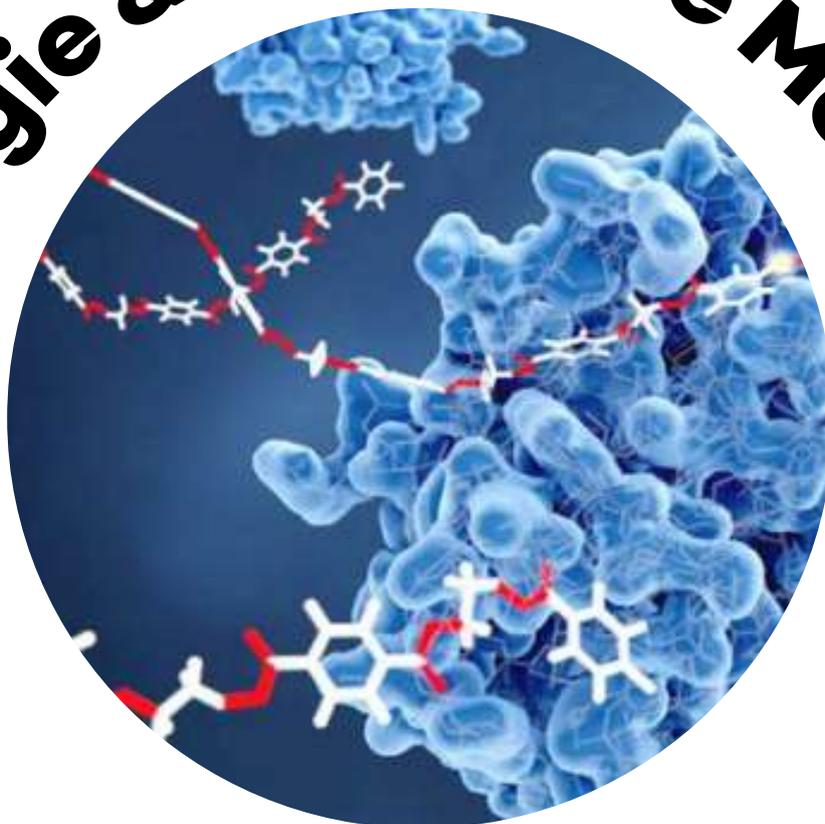


Enzymologie & Biochimie Métabolique



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

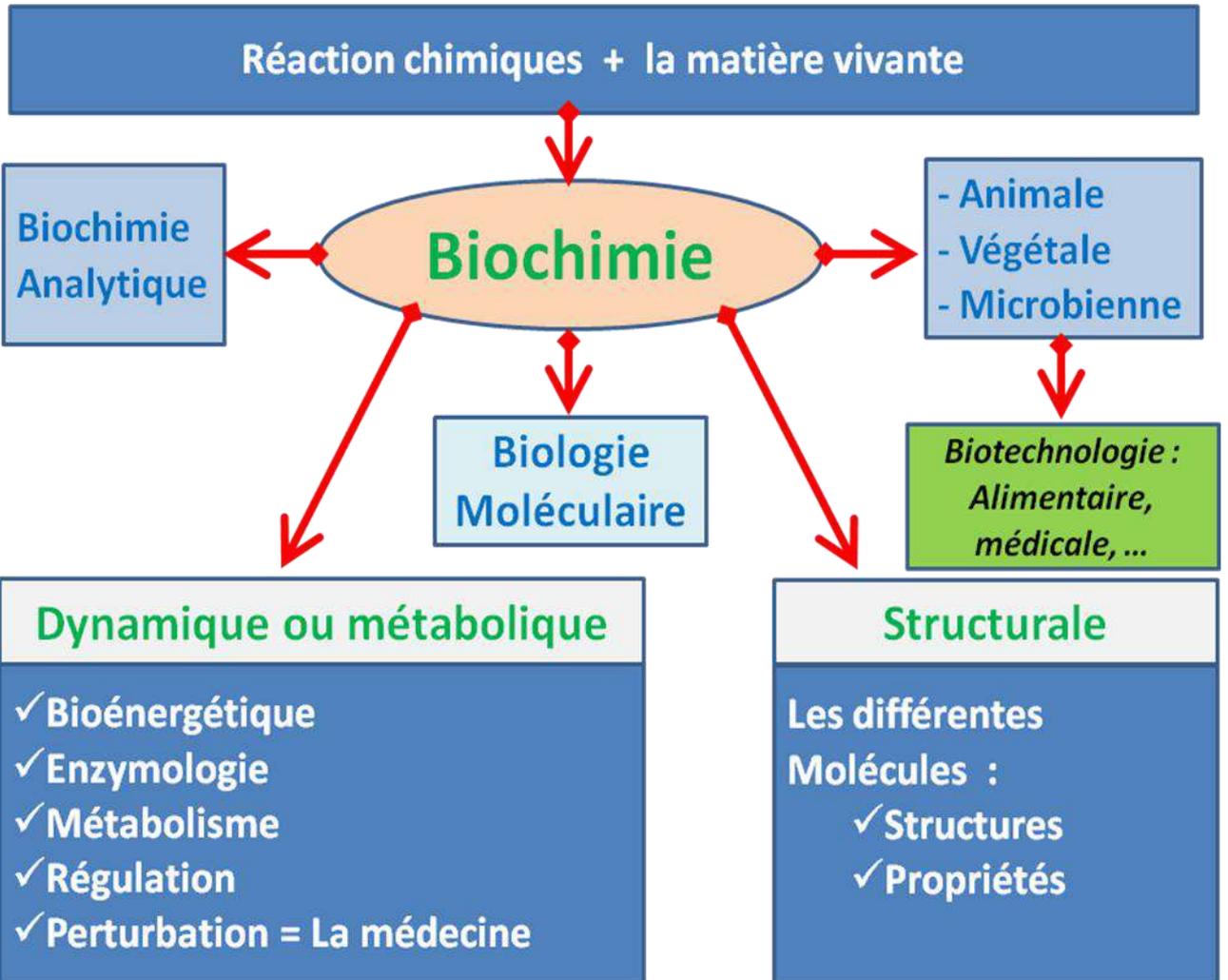
*Université Abdelmalek Essaâdi
Faculté des Sciences de Tétouan
Département de Biologie*

Filière Sciences de la vie

Enzymologie

Pr. Abdenbi BEN DRISS

Année universitaire 2020 – 2021



Chapitre 1

Caractères généraux des enzymes

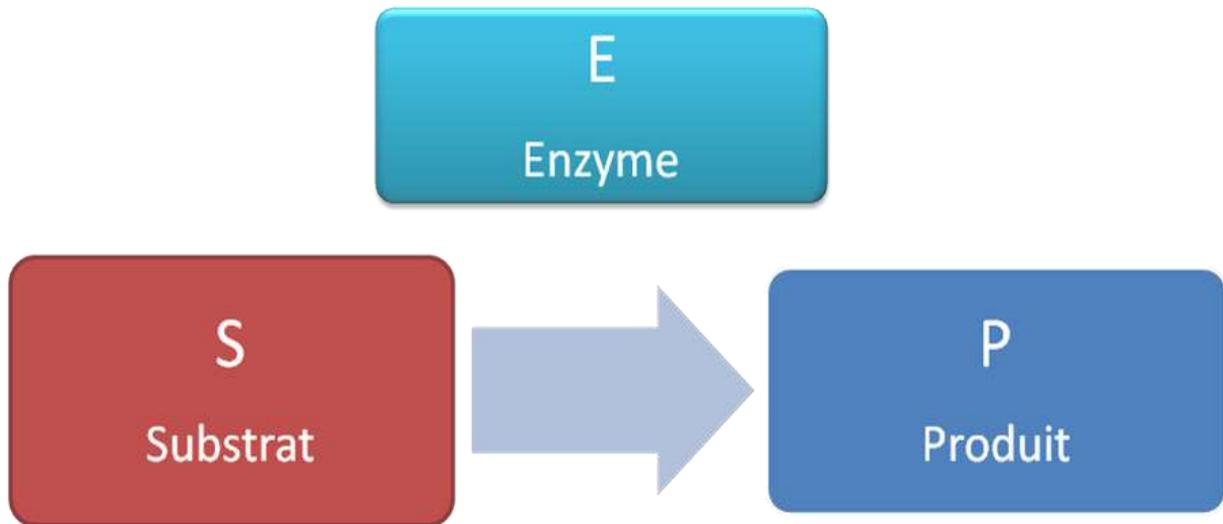
- Préciser le vocabulaire technique de base
- Justifier que les enzymes sont efficaces et la mise en œuvre difficile

- ✓ L'étude des propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes,

- ✓ L'étude de la cinétique enzymatique : la vitesse des réactions catalysées par les enzymes.

- ✓ Toutes les réactions chimiques dans les organismes vivants : enzymes ;

- ✓ Ces réactions définissent : le métabolisme (la biosynthèse et la dégradation des molécules au sein de l'organisme vivant).



- Symbole du substrat
- Symbole du produit
- Symbole d'enzyme : au dessus de la flèche :
 - Intervient dans la réaction
 - Ne se dégradent pas au cours de la réaction
 - Agissent à faible dose

1-Définition des enzymes

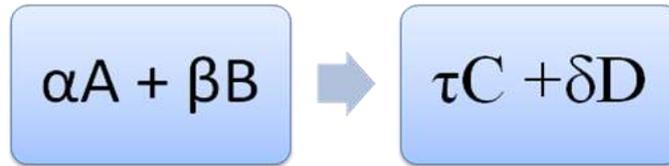


L'enzyme est un ***catalyseur biologique*** de ***nature protéique*** produit par un ***organisme vivant***

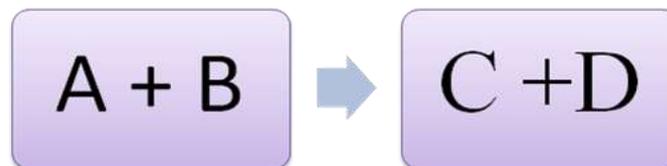
- Qu'est-ce un catalyseur ?
- Quelle est la différence entre un catalyseur chimique et un catalyseur biologique ?

2-La catalyse Biologique

Rappels sur la réaction chimique

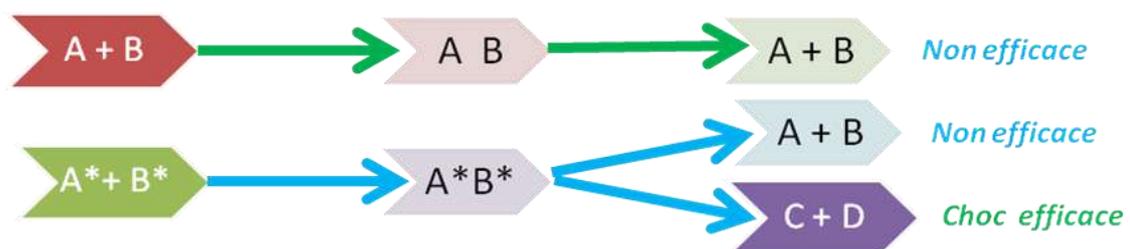


$\alpha = \beta = \tau = \delta = 1$ coefficients stœchiométriques



Cette réaction aura lieu s'il y a :

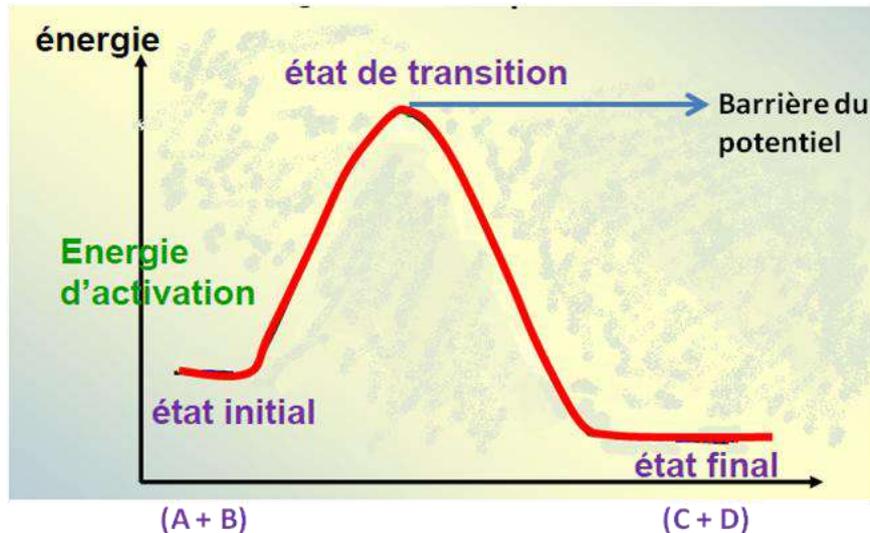
- Rencontre des deux molécules : collision ou choc
- Energie suffisante : formation d'un complexe de transition (A^*B^*)
- Transformation : choc efficace



Vitesse de la réaction chimique :

$$v = k (A^*B^*)$$

- L'évolution de l'enthalpie libre ΔG° de la réaction au cours de la réactions :

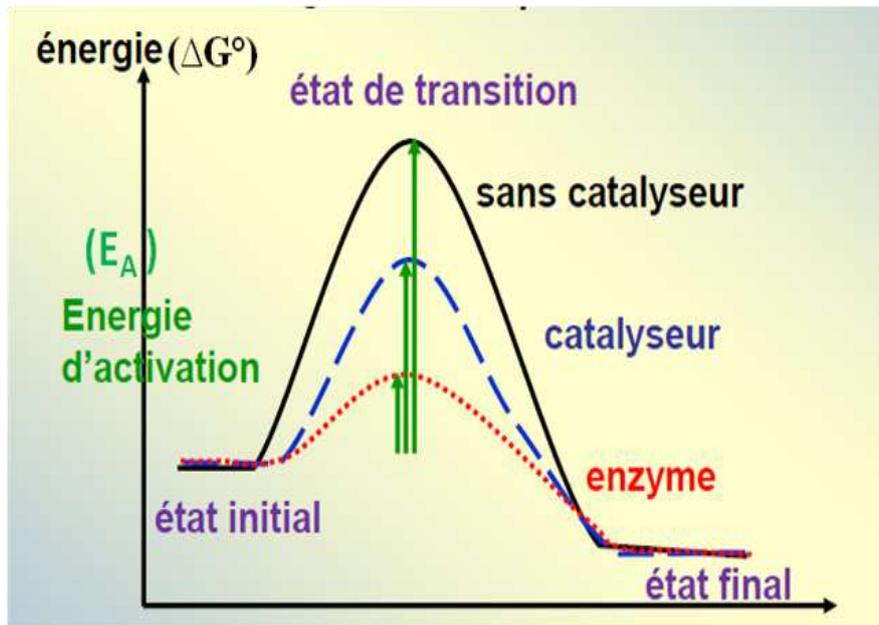


Pour qu'une réaction chimique se produise il est nécessaire :

- Que ΔG° soit négatif
- Que l'activation des molécules se produise pour franchir la barrière du potentiel : *c'est l'énergie d'activation*

Catalyseurs Chimiques et Biologiques

Exemple de la décomposition du peroxyde d'hydrogène :



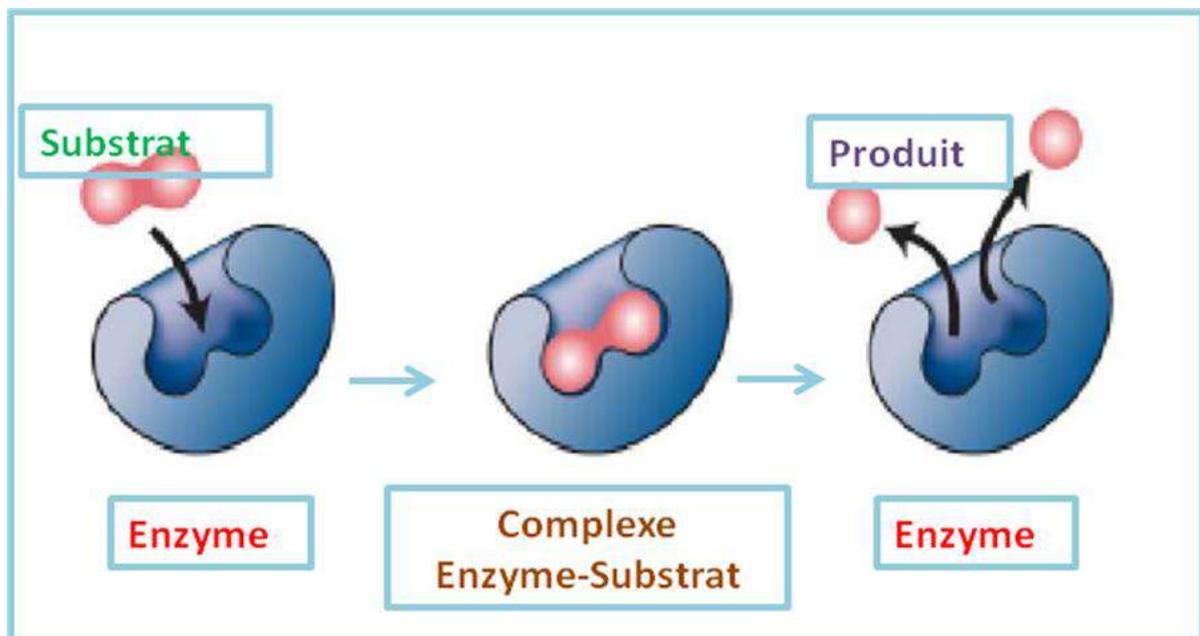
- L'énergie d'activation E_A :
 - ✓ En l'absence de catalyseur : **75.25 KJ/mol**
 - ✓ En présence d'un catalyseur chimique (platine colloïdal) : **48.9 KJ/mol**
 - ✓ En présence d'un catalyseur biologique (enzyme : catalase) : **8.36 KJ/mol.**

- L'hydrolyse de l'amidon :
 - ✓ **Rapide à 40°C avec l'amylase salivaire**
 - ✓ **Lente à 40°C avec H⁺** comme catalyseur
 - ✓ **Rapide à 100°C avec H⁺** comme catalyseur

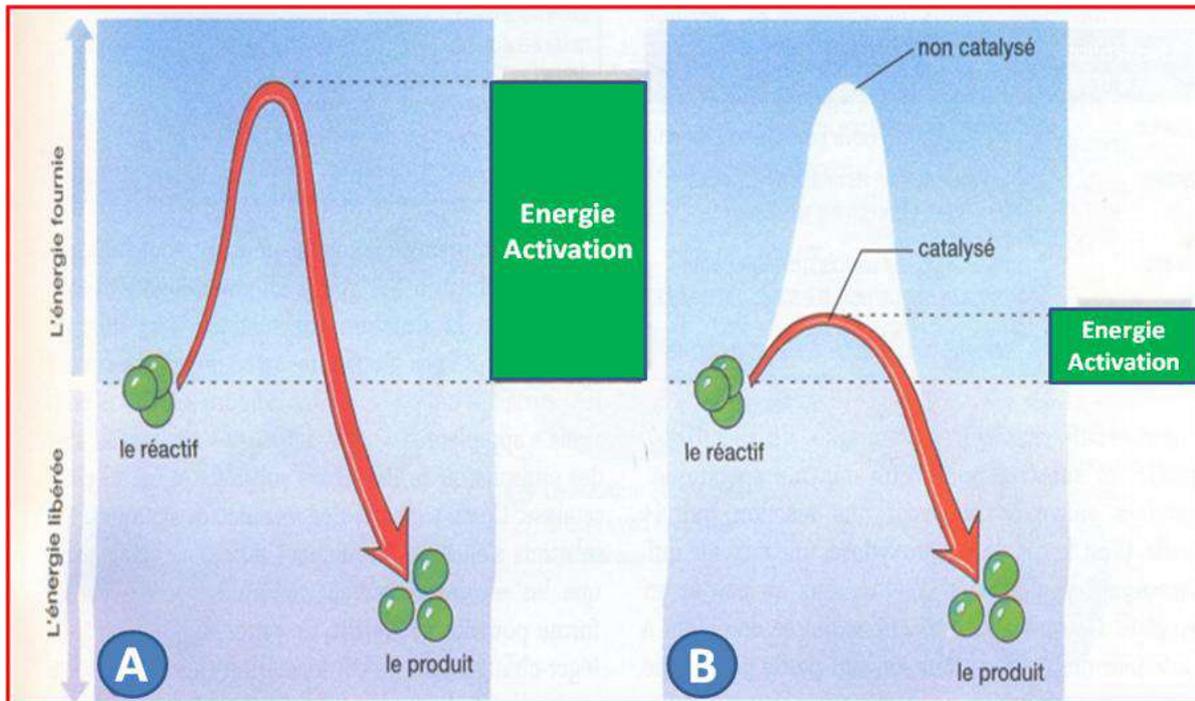
Pour une même vitesse de réaction les enzymes permettent une baisse de température

Origine de l'abaissement de la barrière énergétique :

- La réaction enzymatique suit un chemin différent de la réaction chimique ;
- La réaction enzymatique s'effectue en plusieurs étapes : formation d'un intermédiaire : complexe [ES] ce qui provoque :
 - *Un abaissement de la barrière de potentiel*
 - *Augmentation de la vitesse de réaction*



L'efficacité des catalyseurs biologiques est plus grande que celle des catalyseurs chimiques

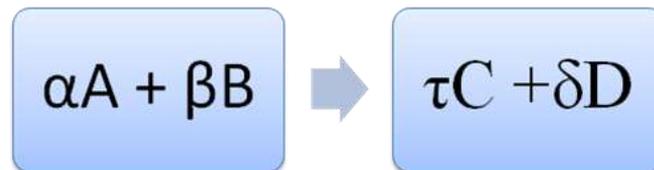


Les enzymes sont des catalyseurs :

- Les enzymes ne catalysent que les réactions thermodynamiquement possibles.
 - ✓ ΔG négatif : réaction possible spontanément
 - ✓ ΔG positif : réaction impossible dans le sens considéré.
 - ✓ Même si ΔG négatif : la réaction dépend aussi de la vitesse de la réaction.

- Les enzymes ne modifient pas l'équilibre de la réaction :

Toutes réaction chimique est caractérisée par une constante d'équilibre k .



$$K_c = \frac{[C]^\tau [D]^\delta}{[A]^\alpha [B]^\beta}$$

- ✓ Cette constante k n'est pas modifiée au cours d'une réaction enzymatique ;
- ✓ Elle reste constante ;
- ✓ La présence d'enzyme permet : atteindre l'équilibre plus rapidement.

Les enzymes sont actifs à faible dose :

Les enzymes ne sont pas transformés au cours de la réaction : ils peuvent être réutilisés à nouveau.

Les enzymes sont des catalyseurs, mais leur particularité : nature protéique.

3-Nature protéique des enzymes

- Macromolécule caractérisée par :
 - Une structure primaire qui est une séquence d'acides aminés ;
 - Une configuration spatiale tridimensionnelle.

Les caractéristiques de cette macromolécule auront trois conséquences

1. Conséquence de la séquence de la structure primaire

- Les enzymes vont avoir des structures différentes selon :
 - La séquence en acides aminés
 - Le nombre des chaînes peptidiques qu'ils comportent
 - Les enzymes à une seule chaîne : RNase, trypsine, ...
 - Les enzymes à plusieurs chaînes : enzymes oligomériques : LDH, isocitrate déshydrogénase, ...
 - Structure quaternaire : le plus souvent ; une activité de régulation.
 - Les enzymes peuvent nécessiter, ou pas, pour leur activité de certains cofacteurs. Les enzymes sont constitués soit :
 - Seulement par la partie protéique : Apoenzyme
 - Ou bien Apoenzyme associée au coenzyme (libre ou fixé).

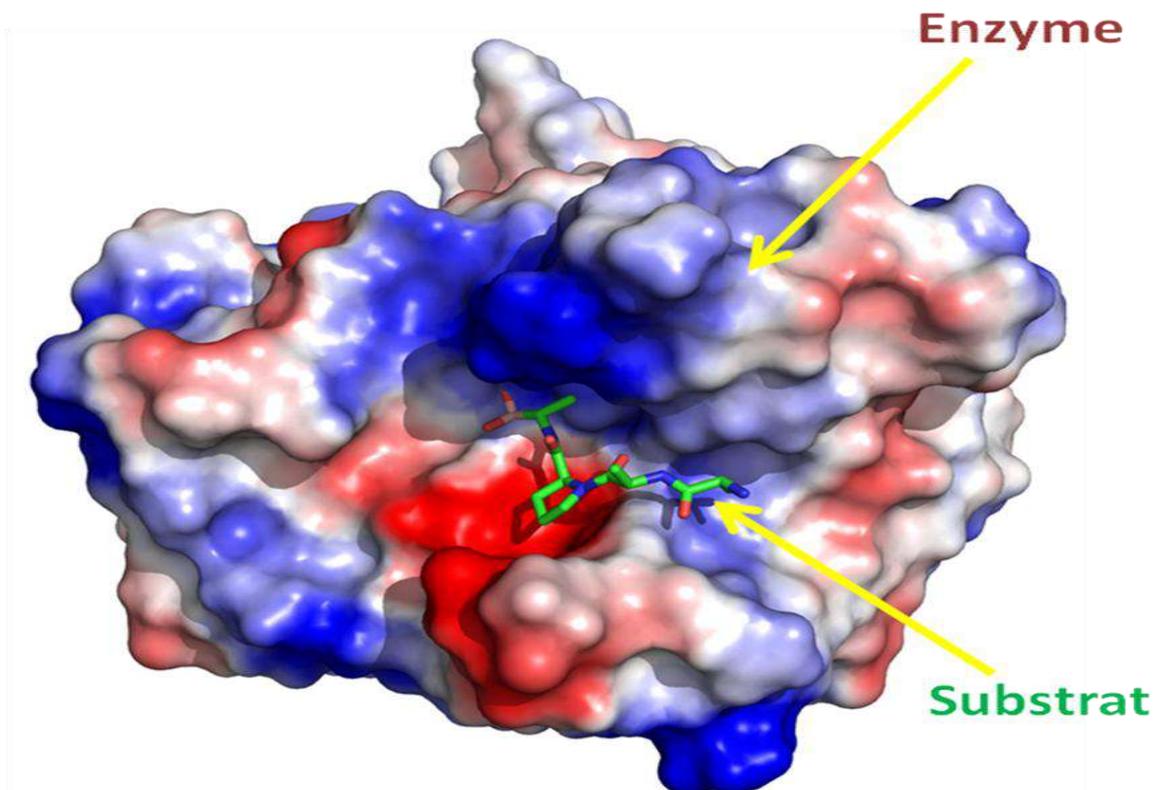
2. Conséquence de la présence d'une configuration ou conformation spatiale

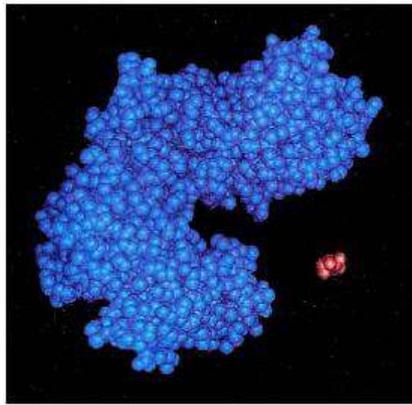
- Cela implique : la sensibilité aux différents agents influençant la structure des protéines :
 - pH
 - Température
 - Force ionique

L'altération (ou dénaturation) de cette structure a pour conséquence l'inactivation de la macromolécule.

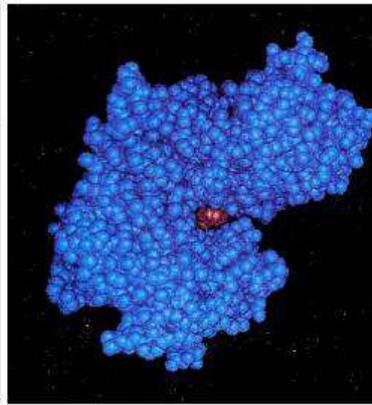
3. Conséquence de la flexibilité de la configuration spatiale

- Suite au rapprochement Enzyme – Substrat : les acides aminés se rapprochent ce qui peut constituer un environnement propice à :
 - La fixation du substrat
 - L'acte catalytique.

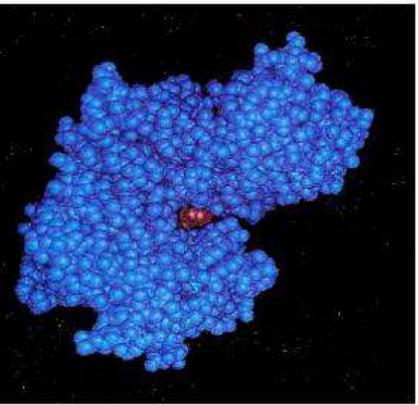




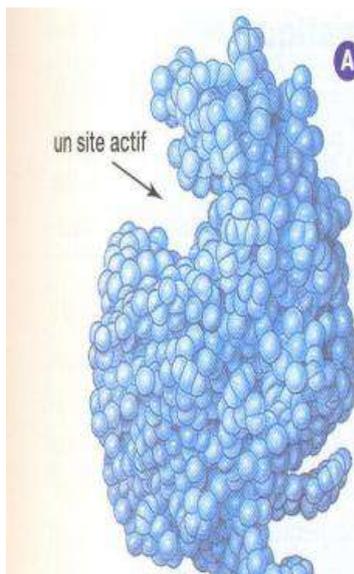
Conformation ouverte
Glucose non fixé sur son site
Pas de catalyse



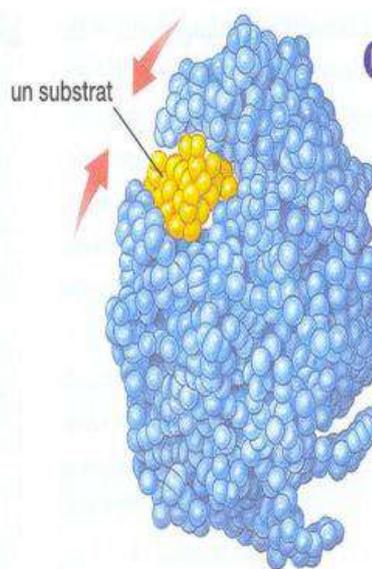
Conformation fermée
Glucose fixé sur son site
Catalyse



Le passage de la conformation ouverte à la conformation fermée implique des déplacements de plusieurs Angströms



A Le site actif dans ce modèle de lysozyme apparaît sous forme de dépression au milieu de l'enzyme.



B Le substrat s'ajuste au site actif. Il induit l'enzyme à modifier sa forme et à le serrer plus étroitement. Ce processus permet à l'enzyme d'interagir chimiquement avec le substrat.

En 1958 (Koshland) : modifie le principe clé serrure à celui de l'ajustement induit :

- Le site actif s'ajuste en change de forme avec le substrat.
- Un enzyme peut accepter plusieurs substrats légèrement différents. (Exemple d'un gant qui s'adaptent à plusieurs mains)

Nature protéique des enzymes

Les enzymes ne peuvent réagir (fixer ou transformer) qu'avec

Des Molécules

D'un seul type

D'une seule
espèce

Les enzymes sont spécifiques

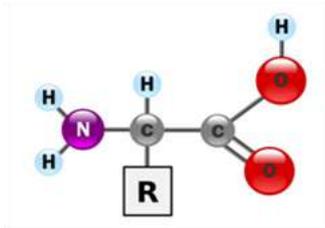
Spécificité enzymatique :

- Elle est double : chaque enzyme sélectionne à la fois :
 - La réaction catalysée
 - Le substrat

Spécificité de la réaction :

- Pour un substrat (S) donné un enzyme ne catalyse qu'une seule réaction parmi celles possibles ;
- La réaction est déterminée par la partie protéine de l'enzyme : la spécificité est liée à l'apoenzyme (partie protéique) ;
- L'environnement moléculaire de l'apoenzyme : oriente le type de réaction.

Exemple du métabolisme des acides aminés :



Dans la cellule, et suivant le cas :

- 1- Décarboxylé par une décarboxylase
- 2- Désaminé et oxydé par une aminoacide oxydase
- 3- Transaminé par une transaminase

Pour tous ces enzymes :

- le coenzyme est le même : Phosphate du pyridoxal ;
- Les apoenzymes sont différents.
- La spécificité de la réaction est assurée par l'Apoenzyme

Apoenzyme définit :

- 1- La configuration spatiale du centre actif
- 2- Le type de réaction se réalisant

- **Spécificité du substrat :**
- Cette spécificité peut être très large ou très étroite avec tous les cas intermédiaires.

-La spécificité large : l'enzyme agit sur beaucoup de types de composés

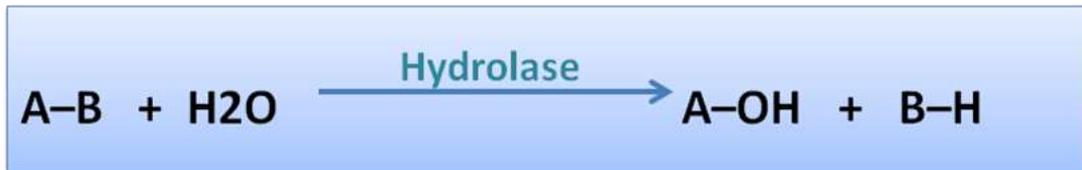
- La spécificité étroite : l'enzyme agit sur un seul composé

De la spécificité la plus large vers la plus étroite , on rencontre :

- La spécificité liée à la nature de la liaison
- La spécificité de groupe fonctionnel
- la spécificité liée à l'acceptation d'un seul substrat
- La stéréospécificité

La spécificité liée à la nature de la liaison

C'est le cas pour les hydrolases, enzymes catalysant la réaction d'hydrolyse du composé A – B :



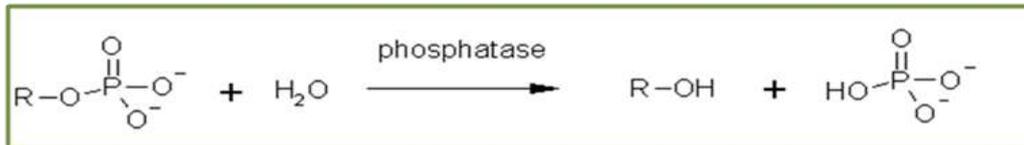
On distingue selon le type de liaison hydrolysée :

- Les osidases : $\text{Ose-O-R} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Ose} + \text{HO-R}$
Oside Alcool
- Les estérases : $\text{R-COO-R}' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R-COOH} + \text{HO-R}'$
Ester Acide Alcool
- Les amidases : $\text{R-NH-CO-R}' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R-NH}_2 + \text{HOOC-R}'$
Amide Amine Acide

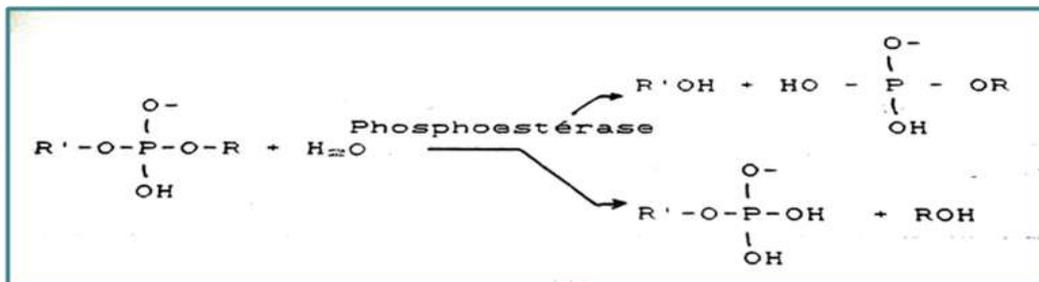
La spécificité de groupe fonctionnel

C'est l'exemple des estérases, on distingue :

- les carboxyestérases : spécifique des liaisons esters où sont engagés des acides carboxyliques :



- Les phosphodiesterases : enzyme qui hydrolyse une des fonctions esters d'un acide phosphorique diestérifié :



la spécificité liée à l'acceptation d'un seul substrat

- Connue depuis longtemps que les enzymes sont spécifiques d'un seul substrat ;
- Le nom de l'enzyme dérive du nom du substrat ;
- L'uréase est spécifique de l'urée.

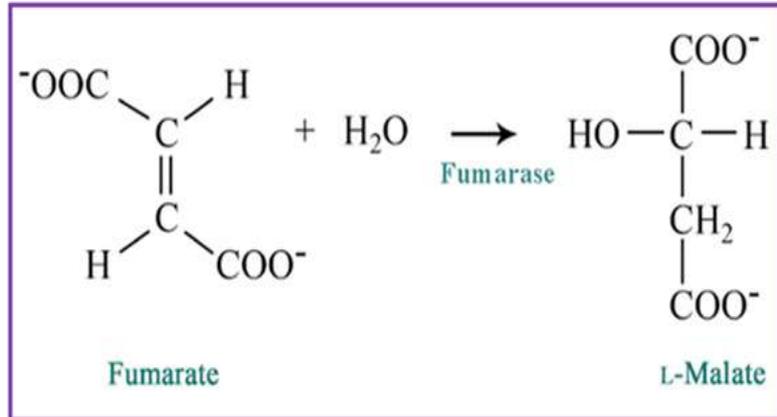
La stéréospécificité

- De nombreux enzymes sont capables de distinguer des isomères ne différant que par la position des atomes dans l'espace : les stéréoisomère.
- Le substrat est constitué d'un seul stéréoisomère:
 - CIS ou TRANS
 - Les formes D ou L
 - Les conformations α et β des liaisons osidiques.

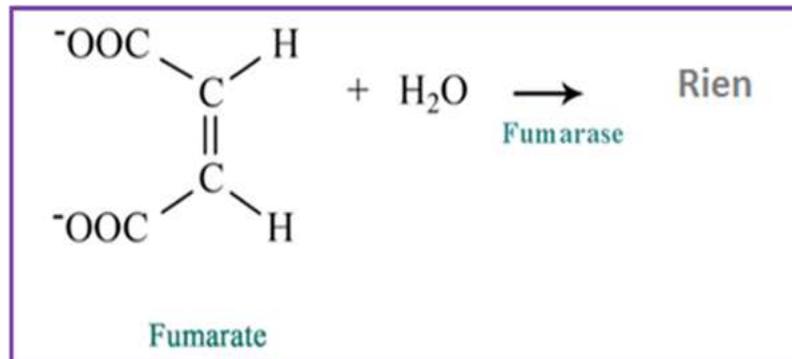
Stéréospécificité liée à l'isomère CIS – TRANS

La stéréospécificité de la fumarase vis-à-vis du fumarate, enzyme du cycle de Krebs :

Fumarate forme TRANS :



Fumarate forme CIS :

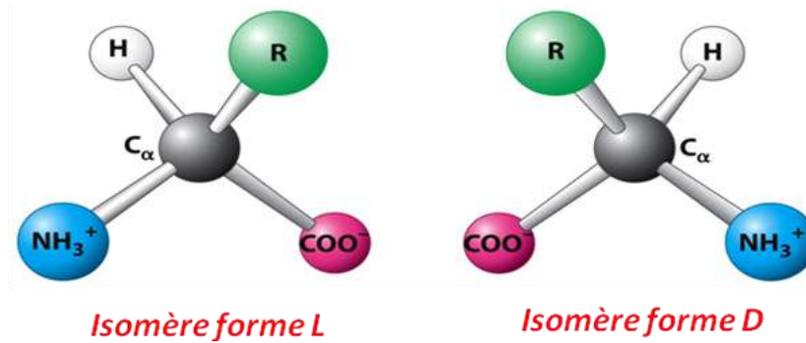


Stéréospécificité liée aux formes D et L

Beaucoup d'enzymes n'acceptent que des substrats d'une seule forme soit D soit L :

- Forme L pour les enzymes des acides aminés
- Forme D pour les enzymes des glucides

Trypsine, chymotrypsine et pepsine n'acceptent comme substrat que les polymères d'acides aminés de la série L.



Stéréospécificité liée aux conformations α et β des liaisons osidiques

- Les enzymes du métabolisme des glucides (osidases) sont le plus souvent stéréospécifique pour les conformations α et β .
- L'exemple des glucosidases et des galactosidases.

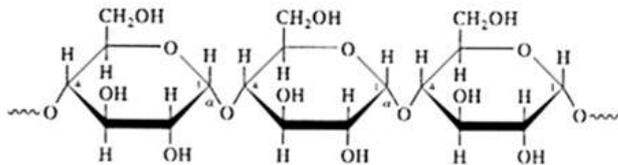
-Les α - glucosidases : les amylases salivaires et pancréatiques hydrolyse les polymères de glucose liés des liaisons α (1 \rightarrow 4).

-Les β - glucosidases : Elles sont, par exemple bactériens, hydrolysant les polymères de glucose liés des liaisons β (1 \rightarrow 4) (cellulose).

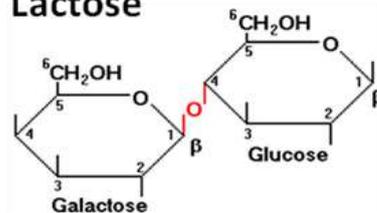
-Les α - galactosidases : lactase, enzyme intestinal qui hydrolyse le lactose.

-Les β - galactosidases : intervient dans de nombreuses réactions qui fait intervenir les β galactosides comme substrat.

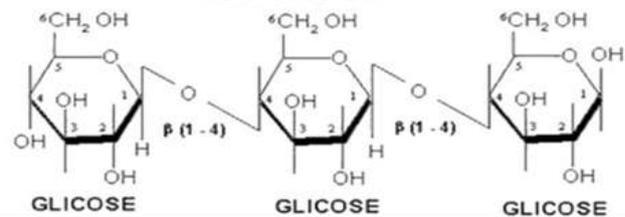
Amidon



Lactose



CELULOSE



- Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui permettent aux réactions chimiques nécessaires à vie et à la multiplications cellulaire :

- De s'effectuer à vitesse élevée et avec une grande spécificité
- D'être modulées : s'adapter aux conditions de l'environnement

4-Nomenclature et classification des enzymes

- Le nombre des enzymes est très important : plus de 500.000 ;
- Certaines enzymes ont des activités semblables : les isoenzymes ;
- Il faut une dénomination claire et précise : quel nom donner aux enzymes ?

Dénomination ancienne :

Toujours utilisé mais peu informative : pepsine qui vient du mot grec « pepsie » qui signifie «coction » et c'est la digestion des aliment par l'estomac.

Deuxième dénomination :

- ✓ Le nom du substrat suivie du suffixe « ase » ;
- ✓ L'exemple : hydrolases, ligases, peptidase, uréase, glucosidases, osidases, etc.
- ✓ Elle est employée couramment.

Nomenclature internationale officielle depuis 1961 :

Exemple du LDH : lactate déshydrogénase

L-Lactate : NAD⁺ - oxydoréductase (EC 1.1.1.27)

- Nom du substrat : L-Lactate
- Le nom de l'accepteur (CoE) : NAD⁺
- Le type de réaction : oxydoréductase
- Le numéro de la classification des enzymes : (EC 1.1.1.27)

Le numéro de la classification des enzymes

- Les enzymes sont classés en : classe, sous-classe et sous-sous-classe puis numérotés.
- 6 classes : suivant le type de réaction :
 - 1: oxydoréductase, 2: transférase, 3: hydrolase,
 - 4: lyases, 5: isomérase, 6: ligase ou synthétase.

Exemple :

Classe 1 : oxydoréductase

1.1 : oxydoréductase agissant sur un groupement >CH-OH
(comme donneur d'hydrogène)

1.1.1. : avec NAD⁺ ou NADP⁺ comme accepteur d'hydrogène

- L- Malate (MDH) : NAD- oxydoréductase (1.1.1.37)

- L- Lactate (LDH) : NAD- oxydoréductase (1.1.1.27)

Chapitre 2

La réaction enzymatique: cinétique enzymatique

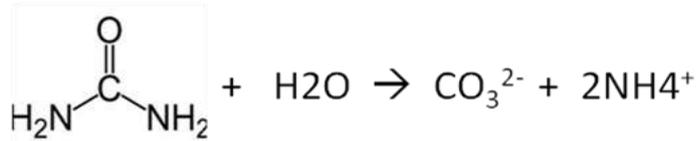
- L'étude de la réaction chimique ou enzymatique = la quantification : définir et mesurer les paramètres caractérisant le système (vitesse, vitesse initiale, paramètres cinétique, ...)
- La quantification est réalisée en se basant sur :
 - *Concepts chimiques : cinétique chimique, vitesse de réaction, schémas réactionnels, ...*
 - *Hypothèses enzymatiques particulières : état stationnaire, complexes intermédiaires)*
 - *Relier les différents paramètres par diverses relations mathématiques plus ou moins complexes*

1-Notion de vitesse initiale

- C'est l'association :
 - La notion classique de la chimie générale : vitesse ;
 - Les conditions initiales : plusieurs conditions influent sur la réaction enzymatique.

a. Mise en évidence de la vitesse initiale : conditions initiales

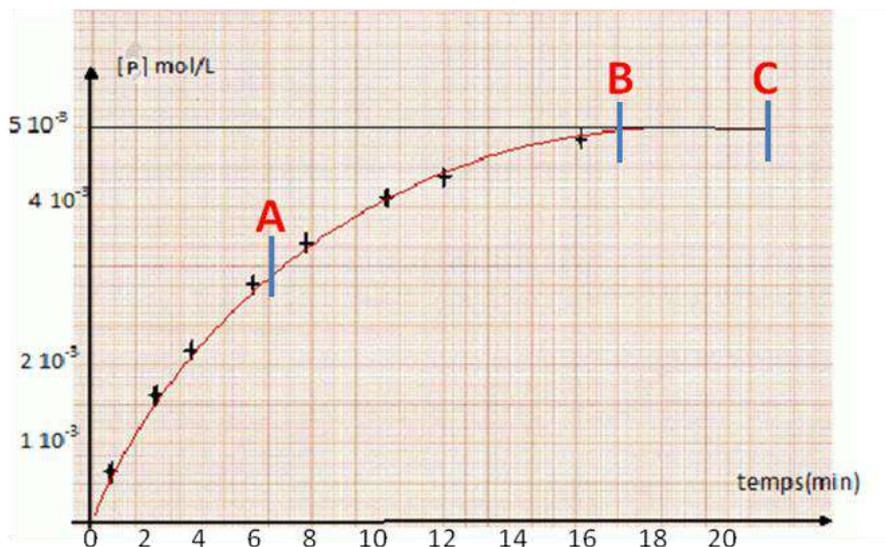
- Approche expérimentale :
 - Réaction enzymatique : hydrolyse de l'urée par l'uréase :



Mettre dans un bêcher placé dans un bain-marie réglé à une température connue (25°C par exemple):

- Une solution d'urée de concentration connue (le substrat) ;
- Un tampon à un pH donné ;
- Un coenzyme en excès (si nécessaire)
- Une solution d'enzyme dans le tampon à une concentration connue.

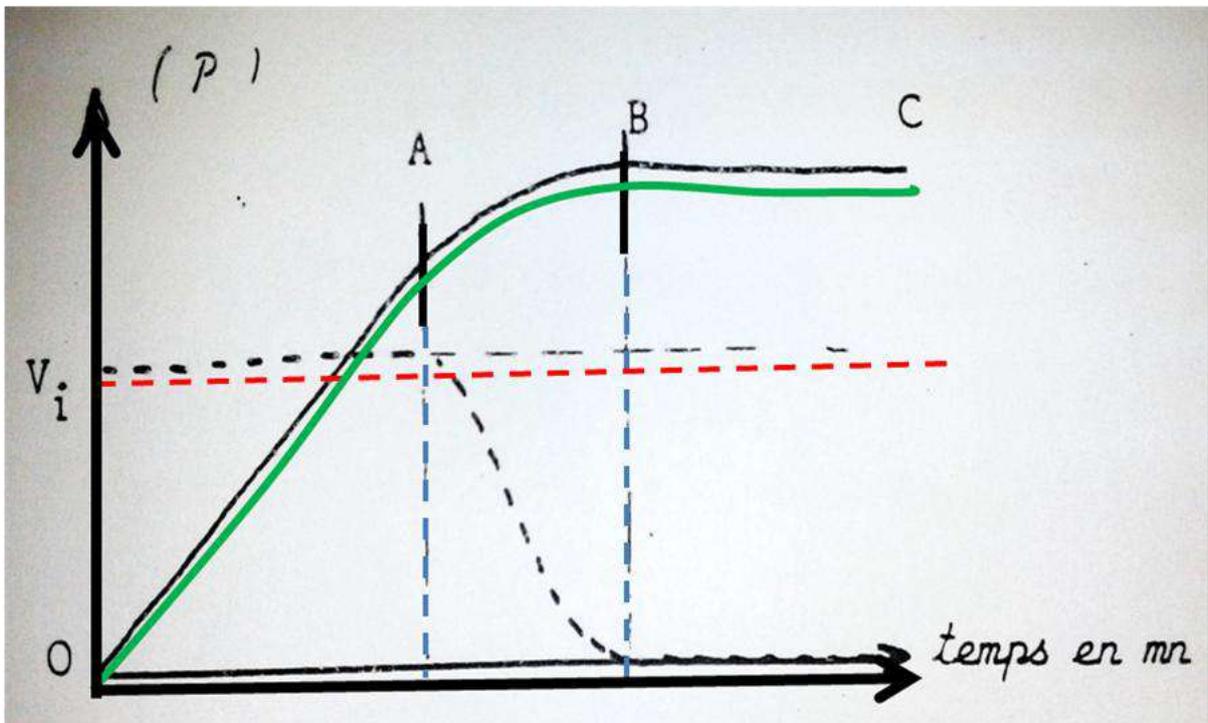
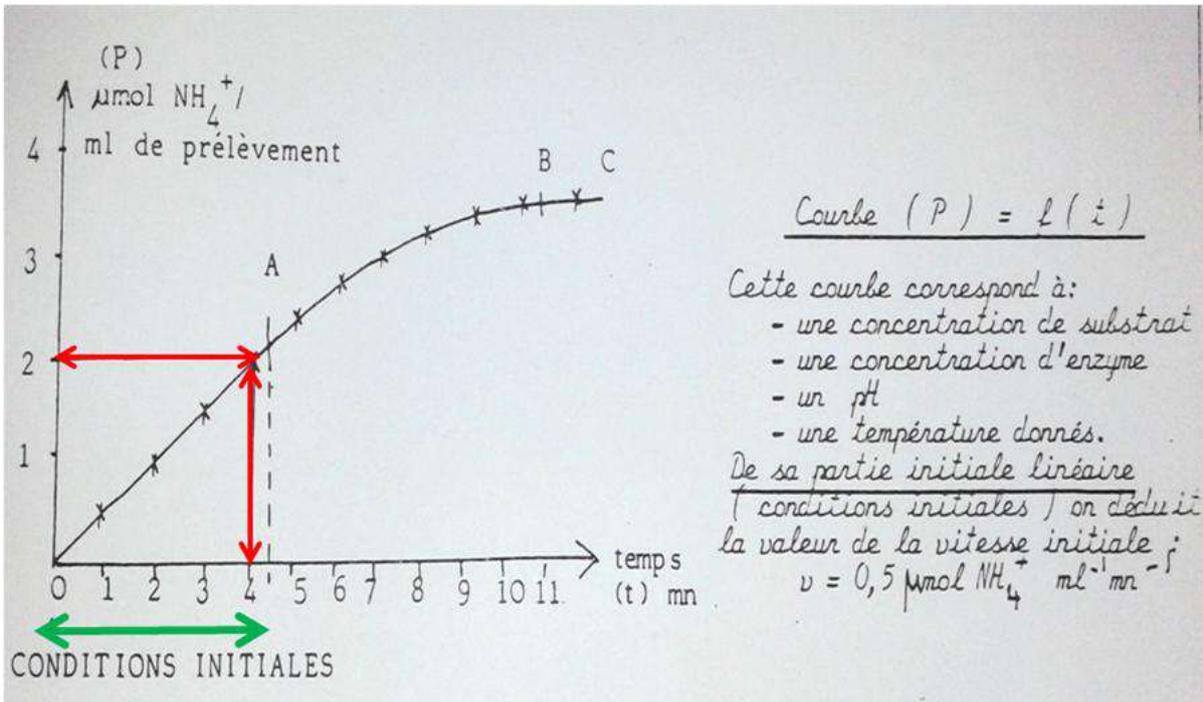
- La réaction est déclenchée : ajout de la solution d'enzyme ;
- Toutes les minutes, on prélève 1 ml du milieu réactionnel ;
- On dose l'ion ammonium par une méthode colorimétrique ;
- On trace la courbe : $P = f(t)$.



Interprétation de la courbe :

- La courbe peut être subdivisée en trois parties :
 1. La première partie de 0 à A : c'est une droite passant par l'origine.
 - La production du produit est proportionnelle au temps.
 - Le rapport du [P] sur le temps (concentration du produit divisée par le temps) est constant.
 - C'est la vitesse de la réaction $v = \Delta P / \Delta t$. Elle est constante durant toute cette phase.
 - La période durant laquelle la vitesse de réaction enzymatique est constante (et non nulle) définit les « conditions initiales ». Notamment la [S] qui est suffisante.
 - Il s'agit de la vitesse initiale v_i
 2. La seconde partie AB : courbe qui s'incurve, la production du produit diminue c'est-à-dire que la vitesse diminue. La [S] est insuffisante.
 3. La troisième partie BC : Courbe parallèle à l'axe des abscisses, la concentration du produit reste constante c'est-à-dire que la vitesse est nulle.

La détermination des vitesses des réactions enzymatiques se fait dans les conditions initiales : il s'agit de la vitesse initiale (v_i).

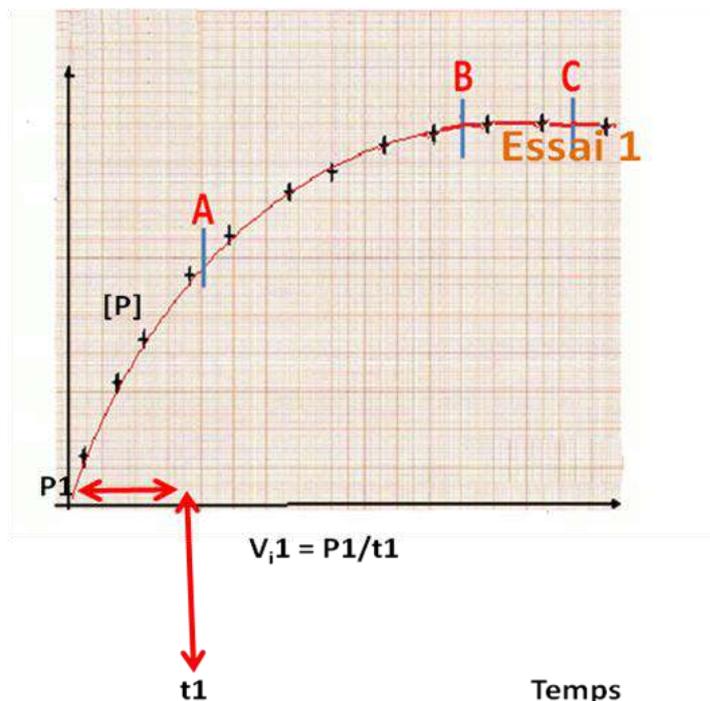


b. Variation de la vitesse initiale

- La vitesse initiale d'une réaction enzymatique varie en fonction de divers paramètres et notamment : $[E]$ et $[S]$.

Variation de la vitesse initiale en fonction de la $[E]$:

On réalise successivement plusieurs cinétiques avec la même concentration de Substrat, le même pH, la même température mais avec des concentrations en enzyme croissantes.



Conditions de réaction :

$-[E] = [E1]$

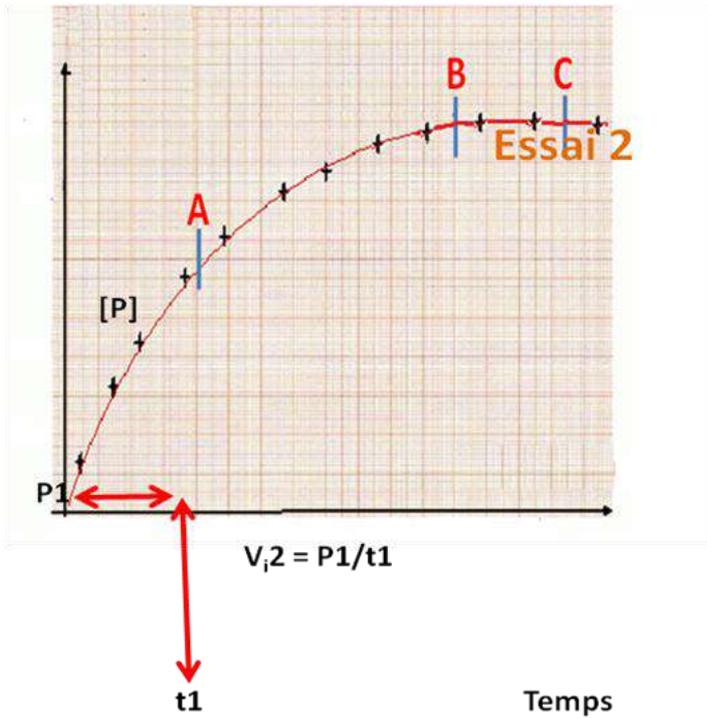
$-[S] = [S_i]$

$-T^\circ = T_i^\circ$

$-pH = pH_i$

Fixés

$$V_{iE1} = 2 \mu\text{mole}/\text{min}$$

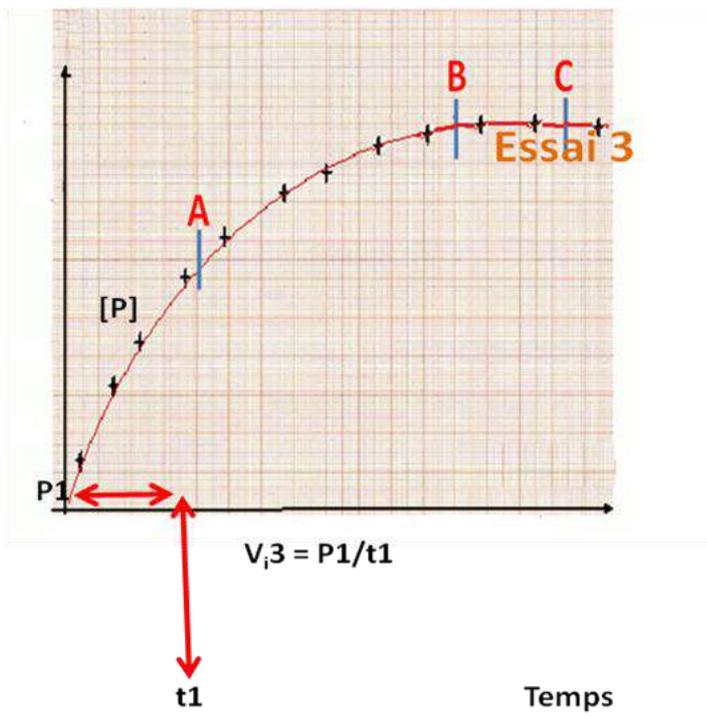


Conditions de réaction :
 -[E1] < [E2] ([E2] = 2 x [E1])

-[S] = [S_i]
 -T° = T°_i
 -pH = pH_i

} Constants

V_iE2 = ? μmole/min



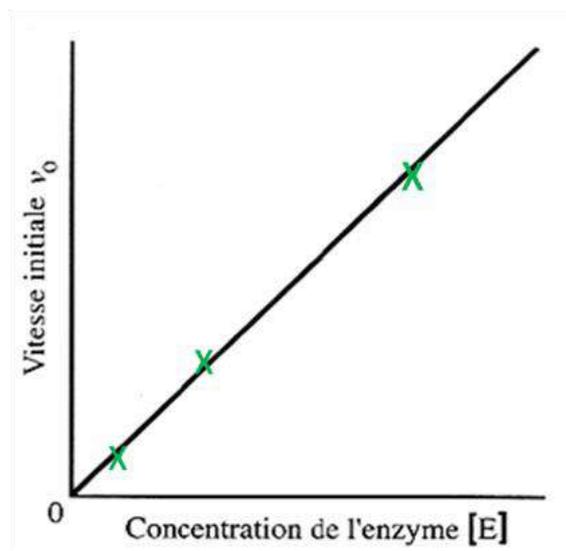
Conditions de réaction :
 -[E2] < [E3] ([E3] = 2 [E2])

-[S] = [S_i]
 -T° = T°_i
 -pH = pH_i

} Constants

V_iE3 = ? μmole/min

- Chaque cinétique permet de déterminer la vitesse initiale ;
 - Chaque vitesse correspond à une concentration en enzyme .
-
- On peut donc représenter la vitesse initiale d'une réaction en fonction de la concentration en enzyme :



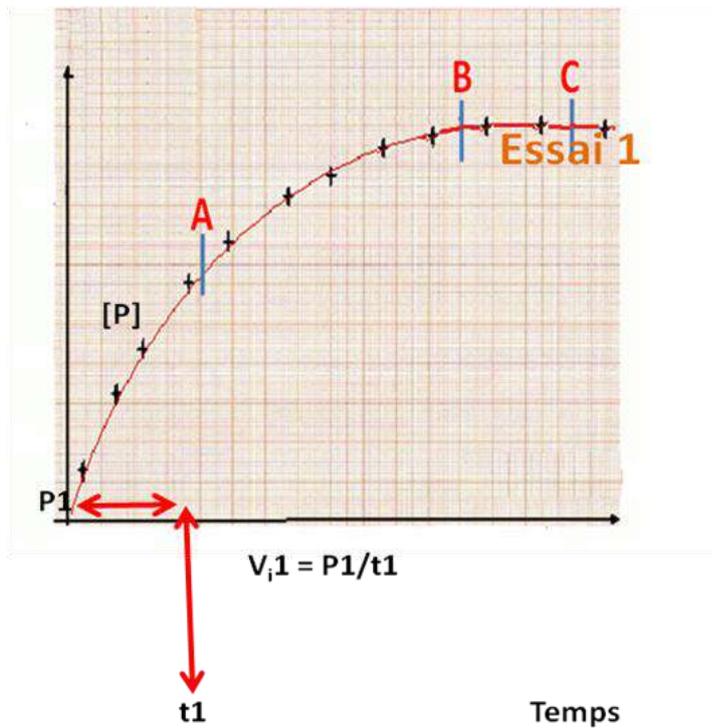
- La courbe obtenue est une droite : la vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la concentration en enzyme.

- Si On augmente la [E] à l'infini ?

→ *La vitesse initiale est proportionnelle à la [E] à condition que le substrat soit saturante*

Variation de la vitesse initiale en fonction de la $[S]$:

On réalise successivement plusieurs cinétiques avec la même concentration en enzyme, le même pH, la même température mais avec des concentrations en substrat croissantes.



Conditions de réaction :

$-[S] = [S1]$

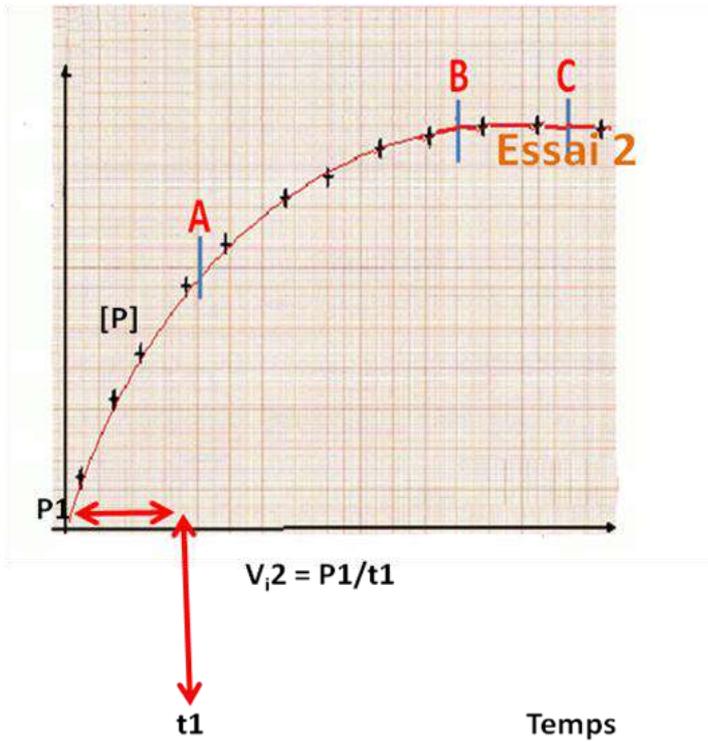
$-[E] = [E_i]$

$-T^\circ = T_i^\circ$

$-\text{pH} = \text{pH}_i$

} Fixés

$$V_{iS1} = 2 \mu\text{mole}/\text{min}$$



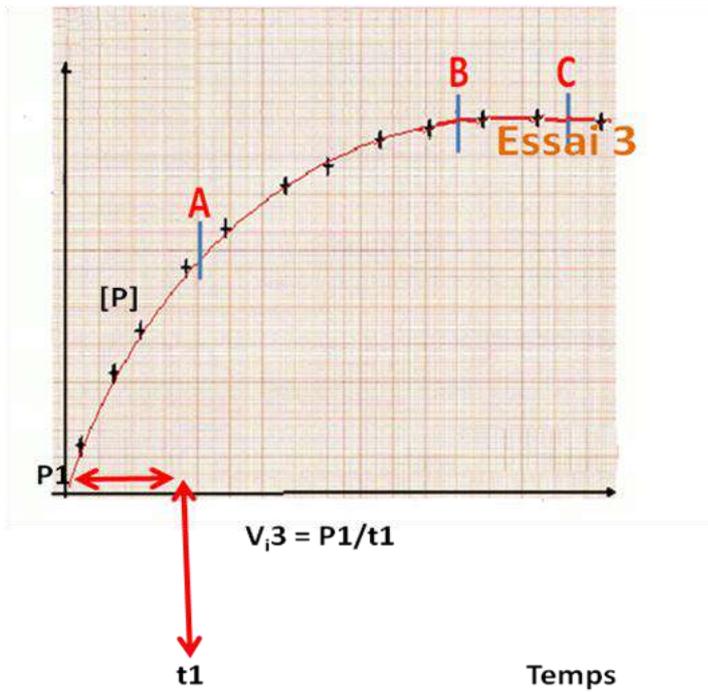
Conditions de réaction :
 $-[S_1] < [S_2]$ ($[S_2] = 2 \times [S_1]$)

$-[E] = [E_i]$
 $-T^\circ = T_i^\circ$
 $-pH = pH_i$

} Fixés

$$V_{i2} = P_1/t_1$$

$$V_{iS2} = ? \mu\text{mole}/\text{min}$$



Conditions de réaction :
 $-[S_2] < [S_3]$ ($[S_3] = 2 \times [S_2]$)

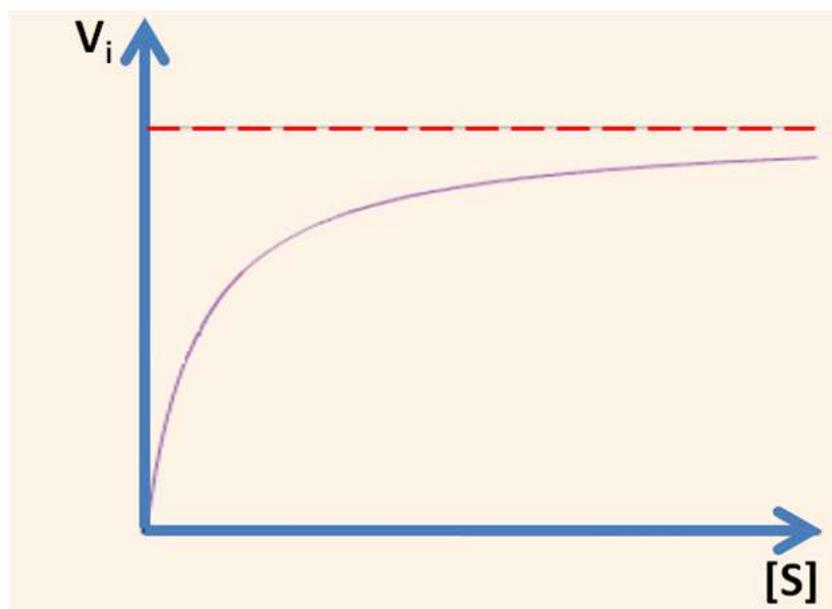
$-[E] = [E_i]$
 $-T^\circ = T_i^\circ$
 $-pH = pH_i$

} Fixés

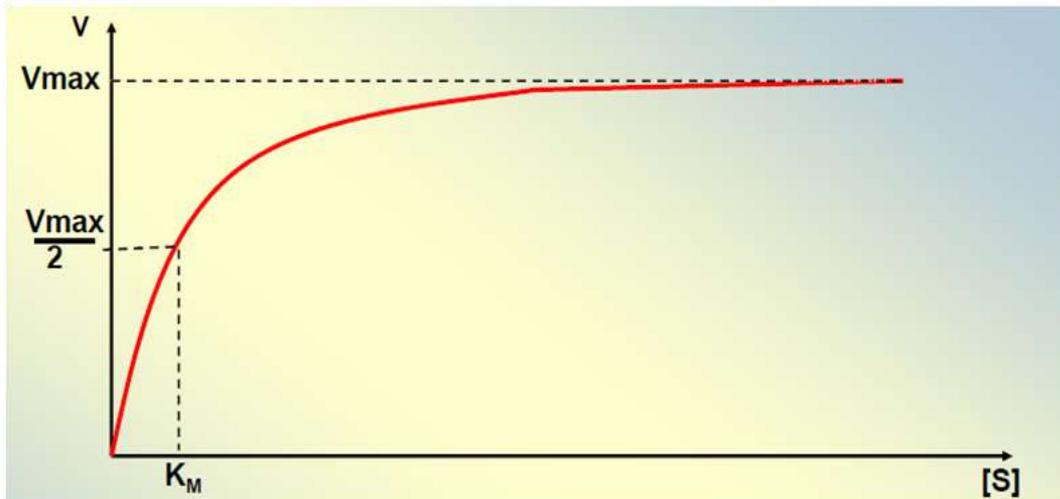
$$V_{i3} = P_1/t_1$$

$$V_{iS3} = ? \mu\text{mole}/\text{min}$$

- Chaque cinétique permet de déterminer la vitesse initiale ;
 - Chaque vitesse correspond à une concentration du substrat .
-
- On peut donc représenter la vitesse initiale d'une réaction en fonction de la concentration du substrat :



- ✓ Cette courbe est très importante, elle caractérise le comportement d'une enzyme pour un substrat donné, dans des conditions expérimentales données (T° , pH,).
- ✓ Elle permet de déduire 2 paramètres caractérisant ce comportement : les paramètres cinétiques de la réaction étudiée.



✓ Les paramètres cinétiques de la réaction K_M et V_{max} :

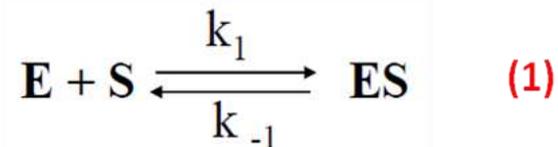
- V_{max} : Vitesse maximale, c'est une vitesse en présence d'une grande concentration du substrat = concentration saturante en substrat ;
- K_M : La concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la V_{max} : c'est la constante de Michaelis, elle représente l'affinité du substrat vis-à-vis de son enzyme.

2-Etude cinétique : Equation de Michaelis

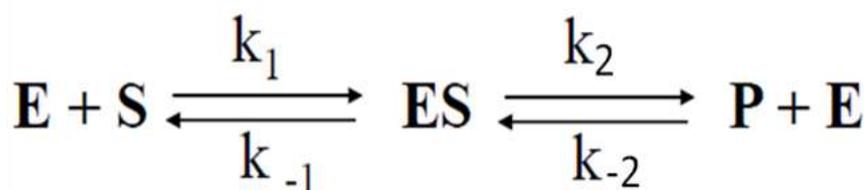
- Le modèle de Michaelis : décrit par Michaelis et Menten en 1913 :
 - Le plus important pour décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit ;
 - Basé sur le complexe [E-S] ;
 - Excellente description du phénomène et du schéma réactionnel ;
 - Il est Vérifié expérimentalement.

a. Equation de Michaelis : modèle simple

- L'élaboration de ce modèle a été basé sur des recherches théoriques à des fins pratiques.
- Hypothèse :
 - la réaction entre l'enzyme et le substrat comporte un intermédiaire ; le complexe E-S ;
 - La réaction est en équilibre.



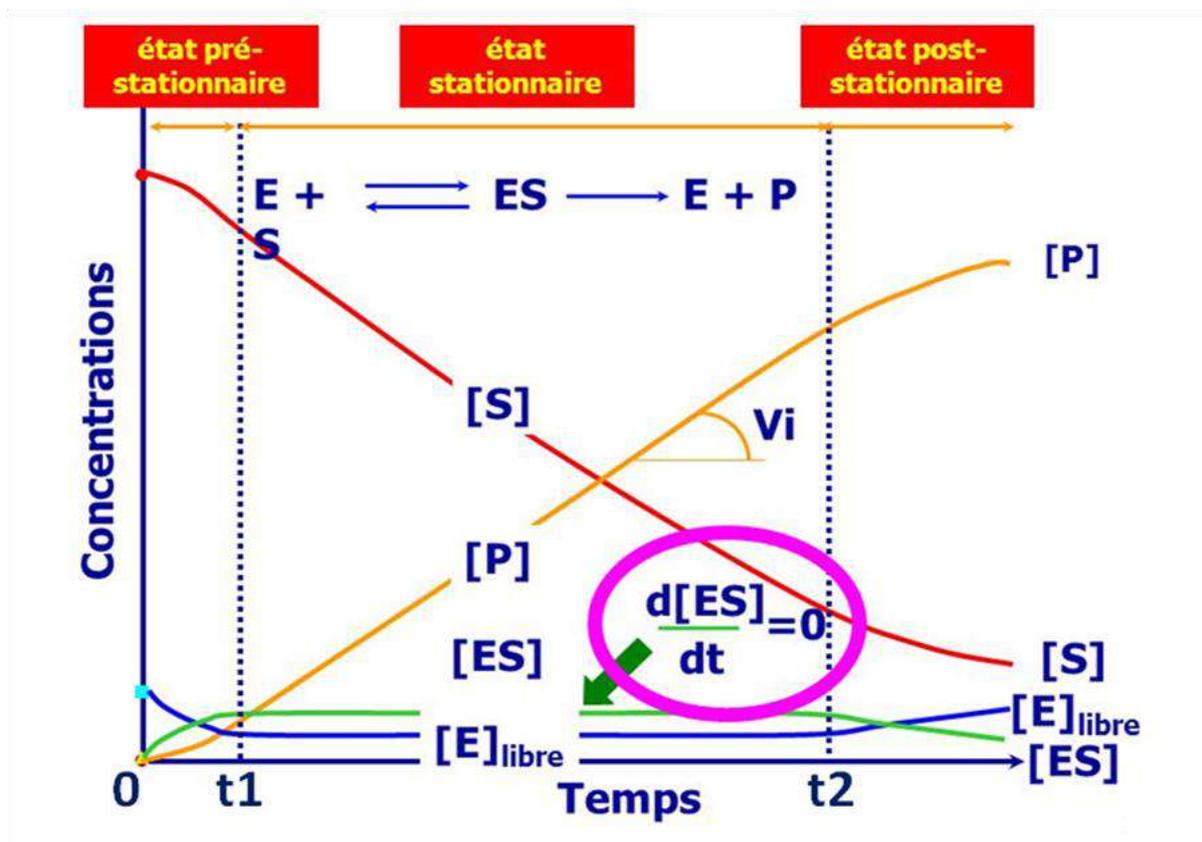
- Par cette hypothèse : calcul de la vitesse
- La décomposition du complexe E-S libère le produit P.



k_1, k_{-1}, k_2 et k_{-2} sont des constantes de vitesses.

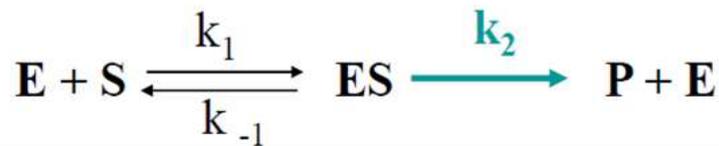
Notions d'états pré – stationnaire, stationnaire et post – stationnaire :

- **Etat pré – stationnaire** : le début de la réaction, la formation du complexe ES augmente.
- **Etat stationnaire** : la concentration du complexe ES se stabilise ; il s'agit des conditions initiales et la vitesse de réaction est constante.
- **Etat post – stationnaire** : la concentration du complexe ES diminue, le substrat commence à s'épuiser progressivement. La vitesse de la réaction diminue pour finalement s'annuler entièrement.



Equation de Michaelis:

- Les paramètres cinétiques de la réaction sont déterminés à l'état stationnaire.
- A l'état stationnaire c'est-à-dire dans les conditions initiales, le modèle se simplifie en :



k_2 est supposé très inférieur à K_1 et k_{-1}

La vitesse de réaction s'exprime par :

$$\text{Vitesse de réaction: } V = k_2 [\text{ES}]$$

$$v = - \frac{d[\text{S}]}{dt} \quad \text{ou} \quad v = \frac{d[\text{P}]}{dt}$$

vitesse de formation de ES: $= k_1 [\text{E}] [\text{S}]$

vitesse de dissociation de ES $= (k_{-1} + k_2) [\text{ES}]$

à l'état stationnaire: $[\text{ES}] = \text{Cste}$ donc $k_1 [\text{E}] [\text{S}] = (k_{-1} + k_2) [\text{ES}]$

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}] [\text{S}]}{\underbrace{(k_{-1} + k_2) / k_1}_{K_m}}$$

$$\longrightarrow [\text{ES}] = \frac{[\text{E}] [\text{S}]}{K_m}$$

K_m est la constante de Michaelis

Vitesse de réaction: $V = k_2 [ES]$

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad \text{si } [S] \gg [E]$$

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) [S]}{K_m} \quad \Rightarrow \quad [ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

$$V = k_2 [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

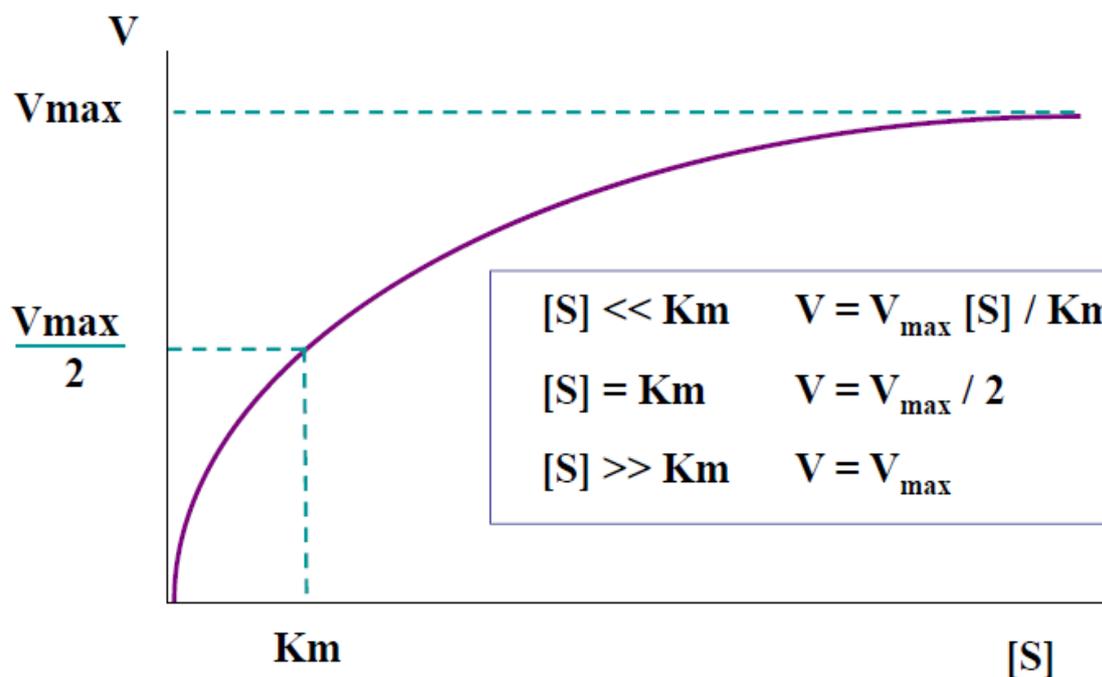
K_m est la constante catalytique

Equation de Michaelis

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

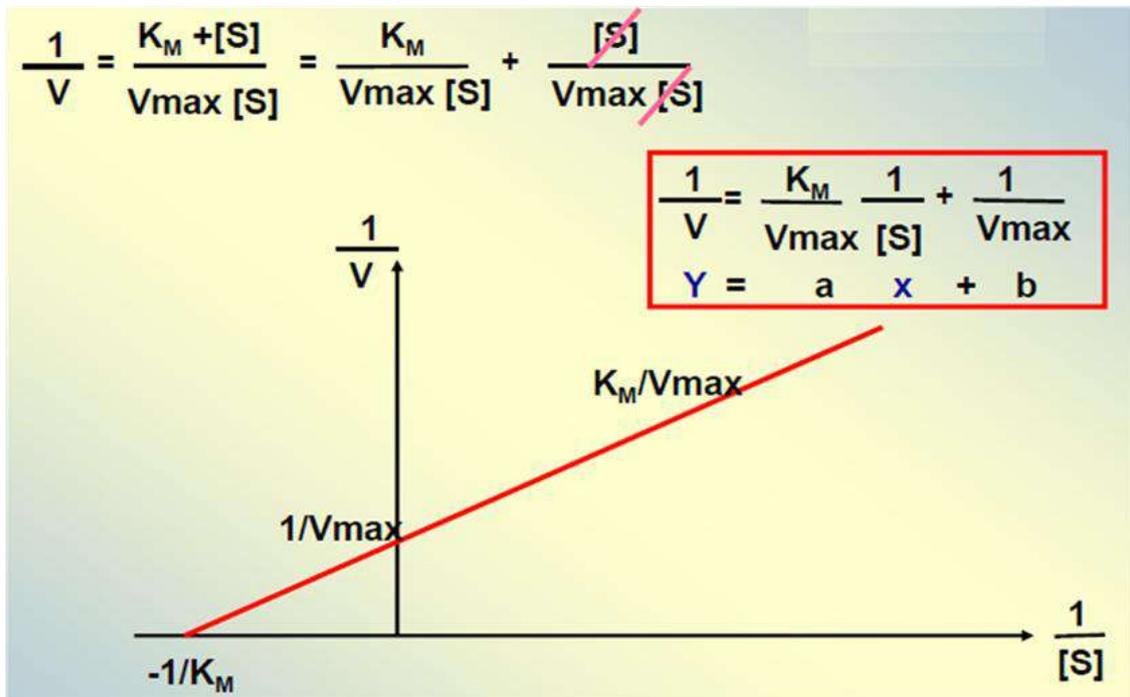
Représentation graphique

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

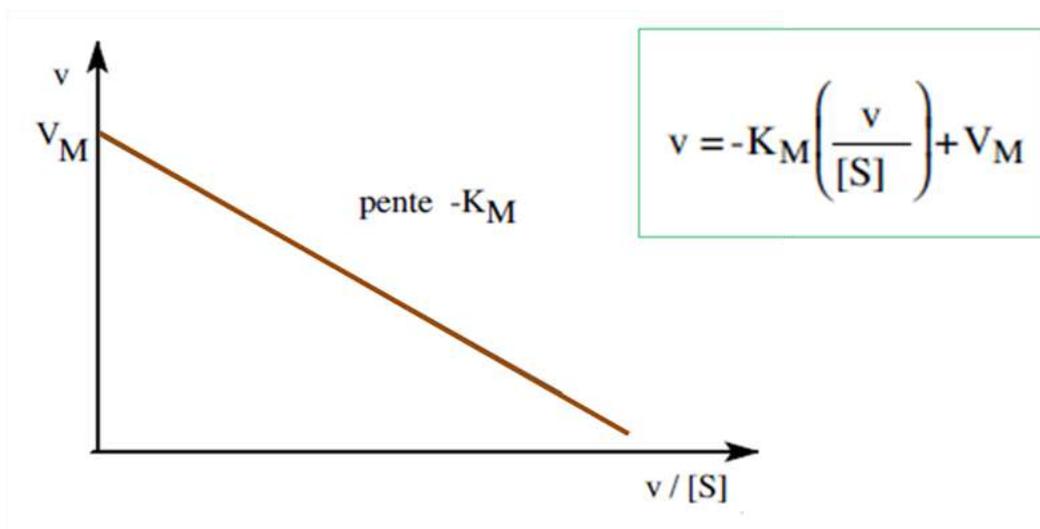


Détermination graphique des paramètres cinétique:

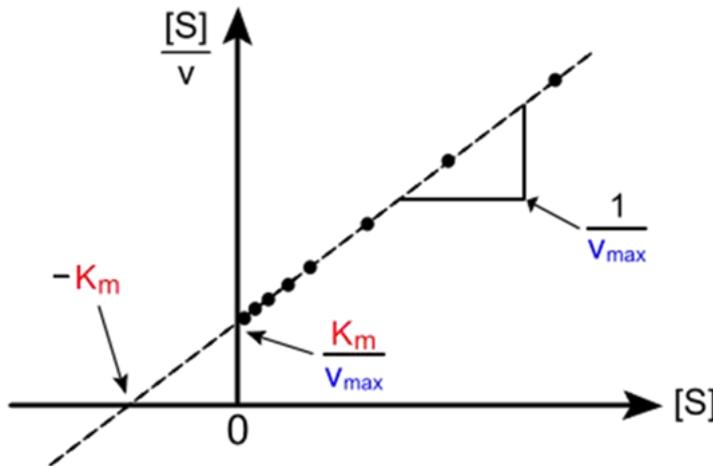
Représentation de LINEWEAVER et BURK : $1/v = f(1/S)$



Représentation de EADIE - HOFSTEE :



Représentation de HANES WOOL :



$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

Ces représentations offrent l'avantage de permettre la détermination plus précise de K_M et V_{\max} . De plus, étant une droite, elle nécessite moins de points expérimentaux.

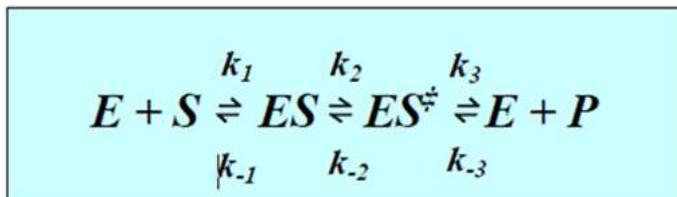
b. Equation de Michaelis : modèle plus complexe

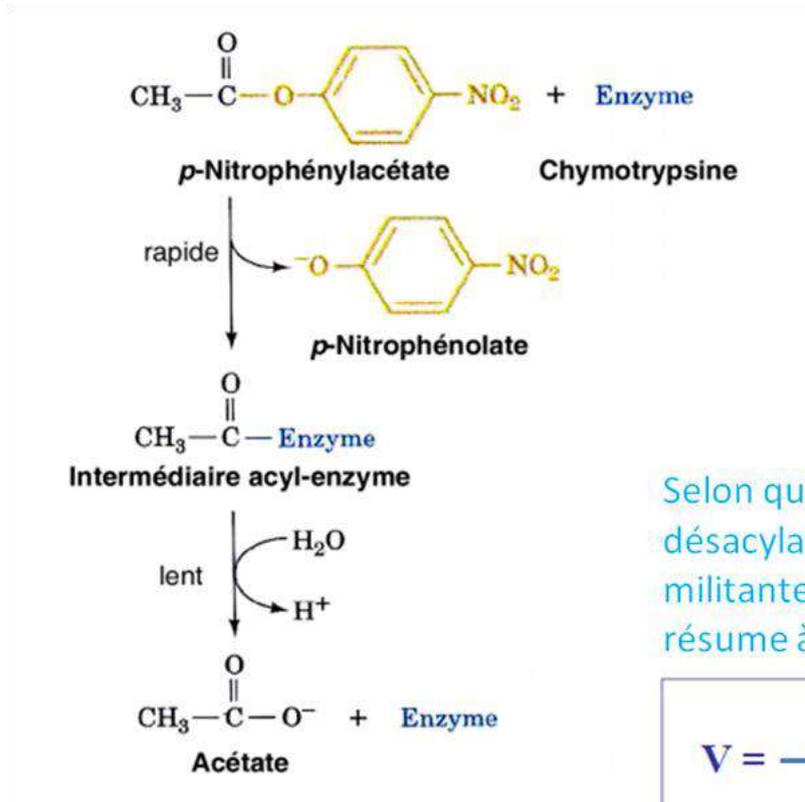
Pour étudier les caractéristiques cinétiques des enzymes d'autres modèles plus complexes ont été proposés mettant en jeu :

- Plusieurs complexes intermédiaires ;
- Plusieurs substrats.

Présence de plusieurs complexes intermédiaires :

Certaines enzymes protéolytiques: enzymes à sérine; une étape d'acylation (acyl – enzyme) et une autre étape de désacylation.





Selon que l'acylation ou la désacylation est une étape limitante ou pas l'équation se résume à :

$$V = \frac{K_{\text{cat}} \cdot [\text{ET}] \cdot [\text{S}]}{K_{\text{Mapp}} + [\text{S}]}$$

Système à plusieurs substrats :

Un seul substrat : simplification du système.

La plupart des enzymes catalysent des réactions à 2 (ou 3 et plus) donnant 2 (ou 3 ou plus) produits.

Réactions à 2 substrats :

Réactions catalysées par oxydoréductases, transférases et ligases



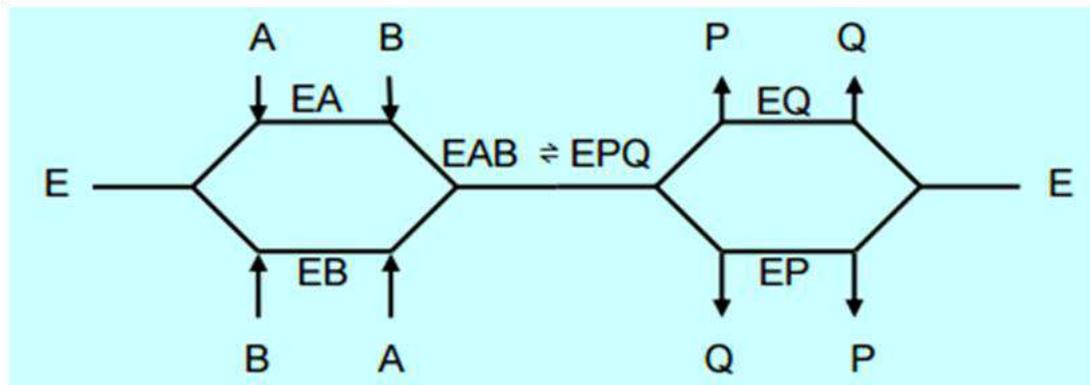
A et B : 2 Substrats

P et Q : 2 Produits

Il existe deux grandes catégories pour les réactions à deux substrats :

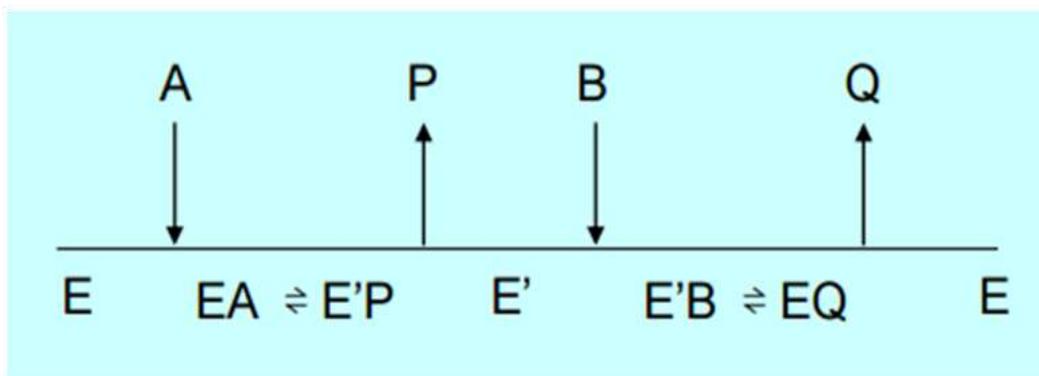
- Complexes ternaires : complexe contenant l'enzyme et deux substrats : l'acte catalytique se réalise en une seule fois ; réaction par simple déplacement.

Mécanisme séquentiel au hasard

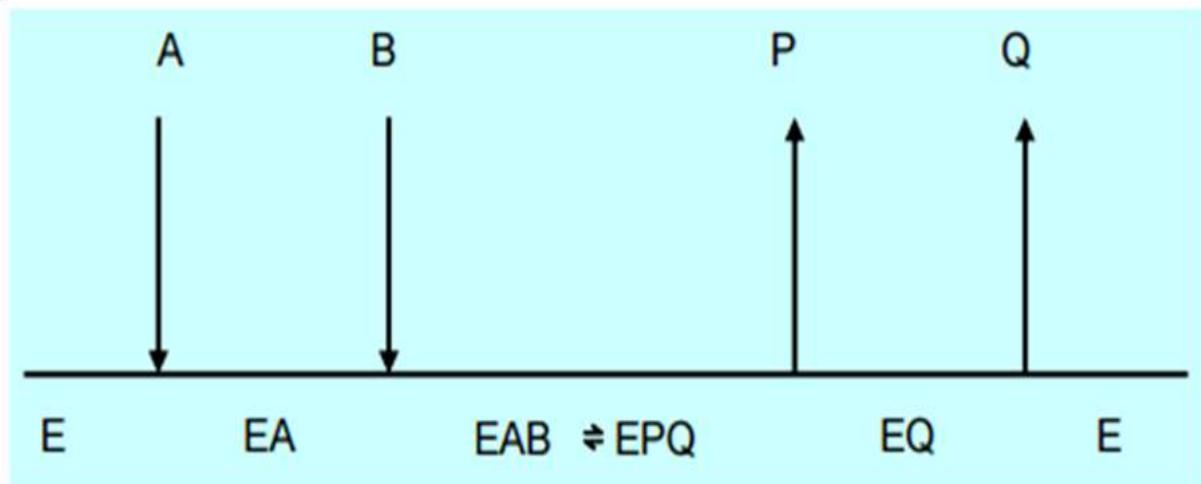


- Complexes binaires : complexe contenant l'enzyme et un seul des deux substrats : l'acte catalytique se réalise en deux fois ; réaction par double déplacement, il provoque une modification de l'enzyme et des deux substrat .

Mécanisme Enzyme substitué (Ping – Pong)



Mécanisme ordonné ou obligatoire



Chapitre 3

Les effecteurs de l'activité enzymatique

Les effecteurs :

- Le sens positif : activateurs ;
- Le sens négatif : inhibiteurs ;
- Non indispensable à l'activité ;
- Coenzyme : indispensable.

Les effecteurs sont de nature physique :

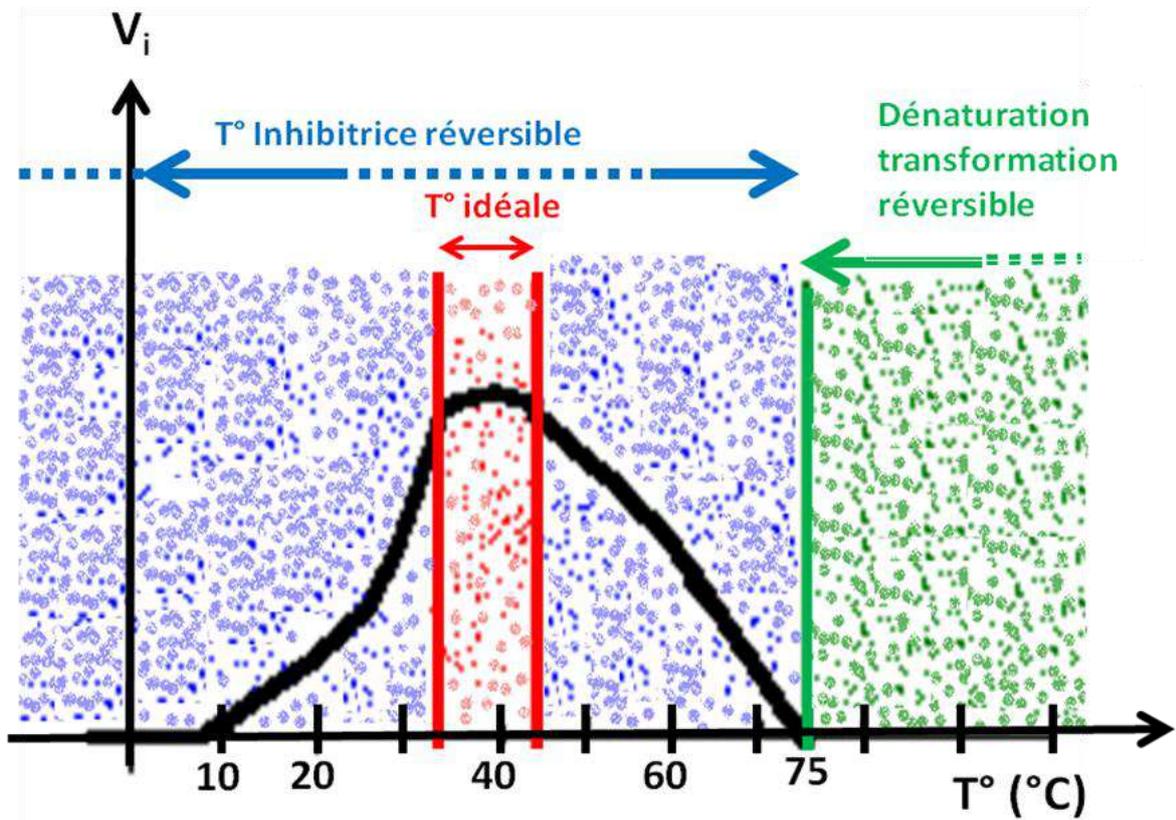
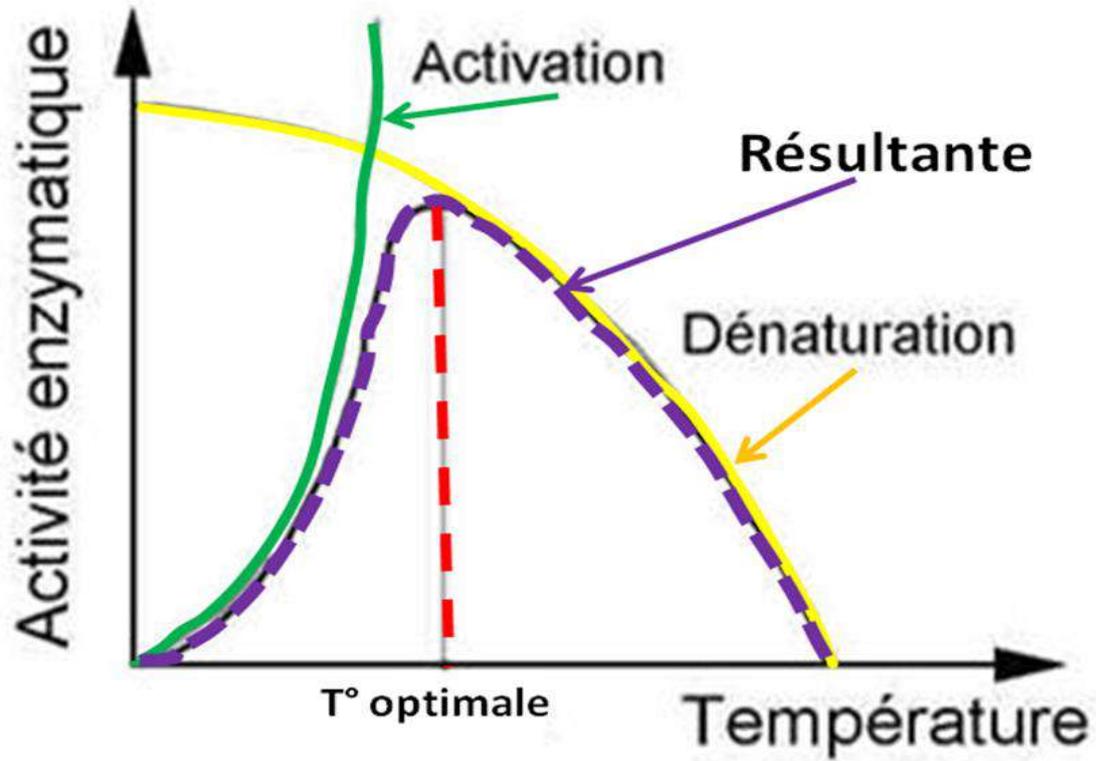
- Physique : température, pH, force ionique, ;
- Chimique : molécules organiques ou minérales.

1. Effecteurs physiques

a). Influence de la température

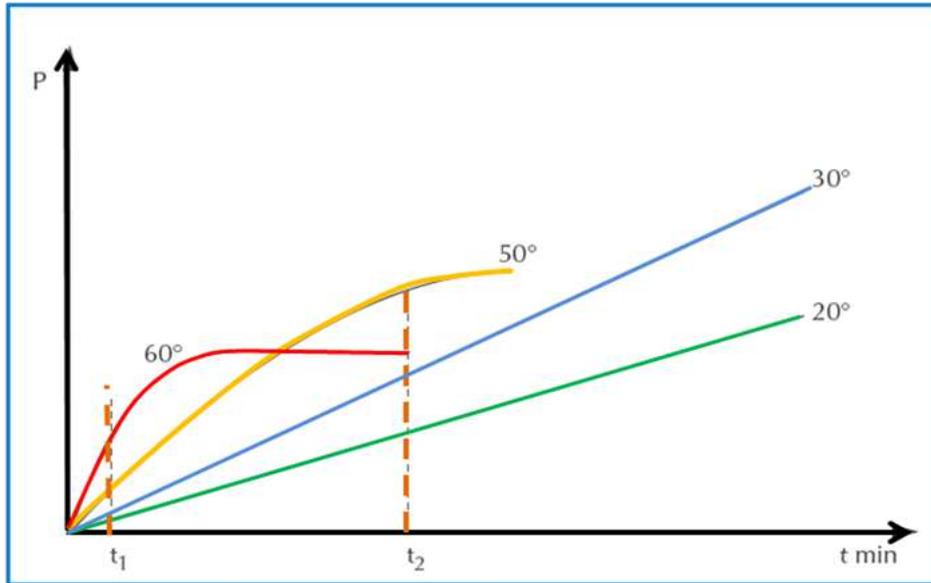
L'action de la température est la résultante de deux phénomènes :

- L'activation des réactions chimiques par la chaleur ;
- La dénaturation des protéines par la chaleur.



Détermination de la température optimale ou idéale, elle dépend des conditions expérimentales :

- Temps de chauffage : pour un temps t_1 , la température optimale est de 50°C , pour un temps t_2 , elle de 30°C ,
- La présence des effecteurs, du substrat,



Activation de la réaction par la chaleur : Loi d'ARRHENIUS

La température fait augmenter la vitesse des réactions enzymatiques comme celle de toutes les réactions chimiques : Loi d'ARRHENIUS qui fait prévoir l'effet de la température sur la constante de vitesse de la réaction.

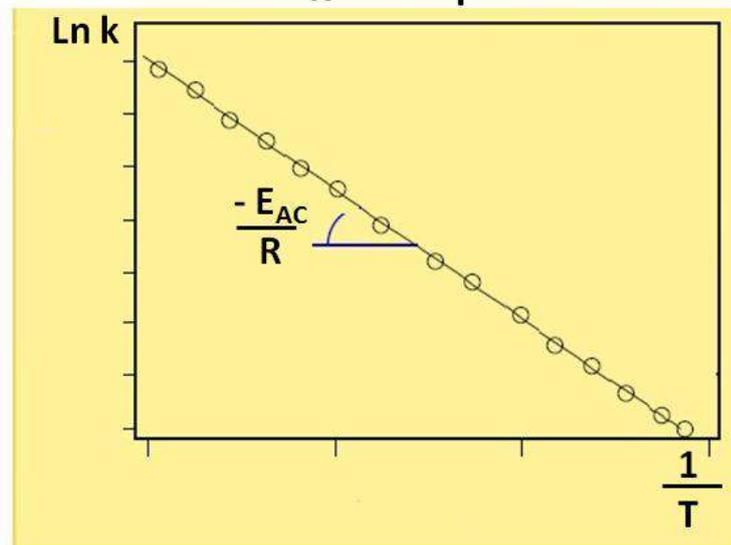
$$K = A \cdot e^{\left(-\frac{E_{Ac}}{RT}\right)}$$

K : la constante de vitesse ; **A** : une constante ; **E_{Ac}** : Energie d'activation

- Cette loi valable : un domaine de température : les enzymes se dénaturent vers $45 - 50^\circ\text{C}$.
- Il existe des enzyme « thermorésistantes » (100°C).
- Le paramètre caractérisant le comportement enzymatique : Energie d'activation :

Equation d'ARRHENIUS :

$$\ln k = -\frac{E_{AC}}{R} + \frac{1}{T} \cdot \ln A$$



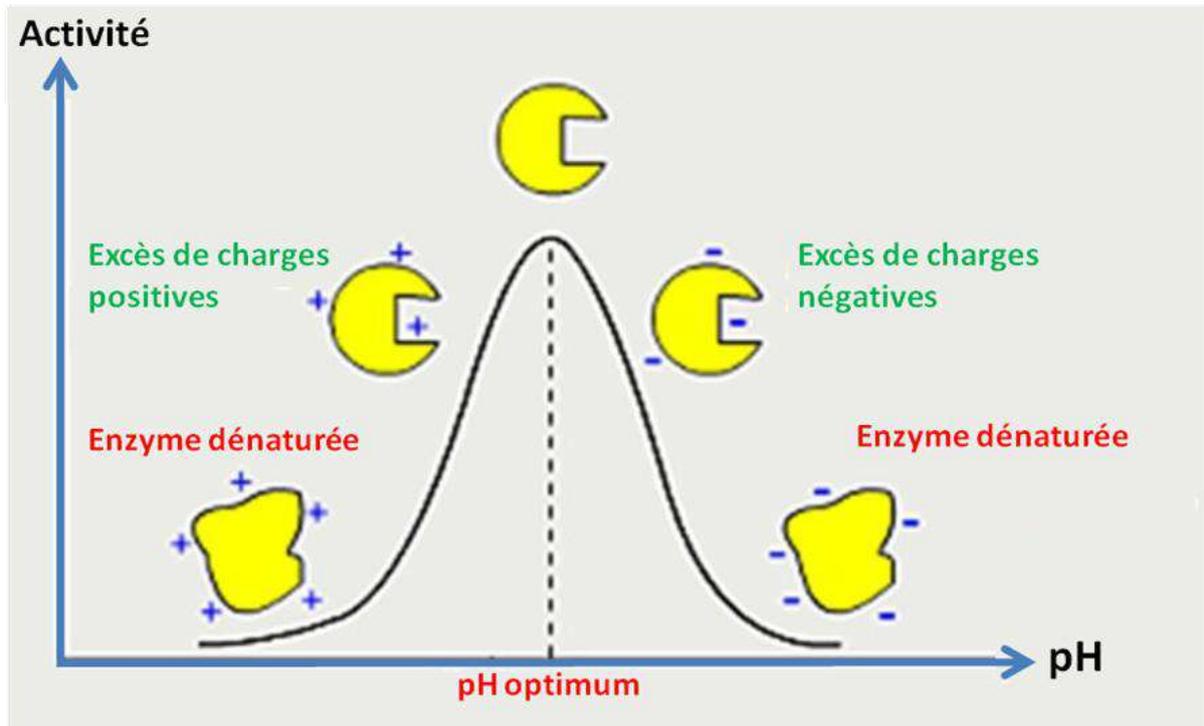
Pour la plupart des enzymes de mammifères la vitesse de réaction est multipliée par un facteur de 2 à 4 lorsque la température est augmentée de 10°C .

Dénaturation et inactivation des protéines par la chaleur :

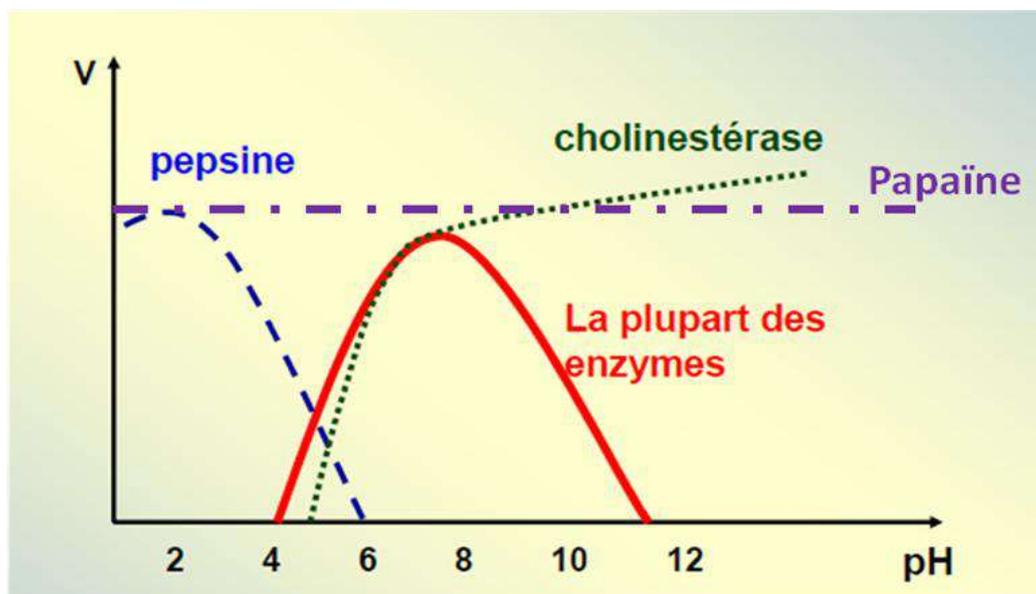
Quand la température augmente :

- ✓ Les atomes ont une plus grande énergie ;
- ✓ Augmentation de mouvement ;
- ✓ Acquisition d'une énergie suffisante pour vaincre la structure globulaire des enzymes ;
- ✓ Dénaturation et l'inactivation.

b). Influence du pH



- ✓ Le contrôle du pH : un tampon ;
- ✓ Réactions biologiques : la plupart à pH neutre ;
- ✓ Enzyme pH très acide : enzyme de l'estomac (pepsine) ;
- ✓ Enzyme pH très basique : cholinestérase
- ✓ Enzyme indifférente du pH : papaïne.



2. Effecteurs chimiques

- Les effecteurs : module l'activité enzymatique ;
- Augmentation de l'activité : activateurs ;
- Diminution de l'activité : inhibiteurs
- Interactions : avec le substrat ou avec l'enzyme ;
- Mode d'action : réversible ou irréversible ;
- Les effecteurs endogènes : Rôle physiologique (régulation du métabolisme cellulaire) ;
- Les effecteurs exogènes : environnement et pollution.

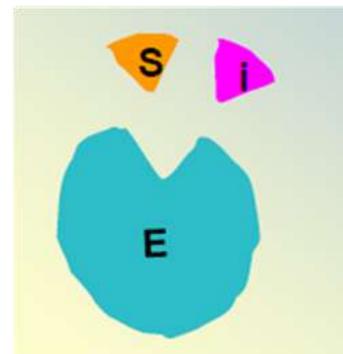
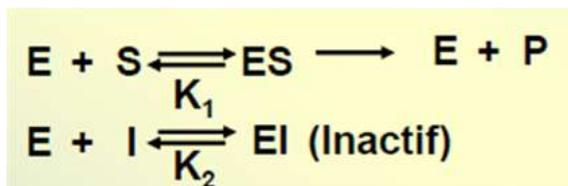
a). Les inhibiteurs

Inhibition réversible

Combinaison enzyme – effecteur

Inhibition compétitive

Inhibiteurs compétitifs : en générales sont des composés dont la structure ressemble au substrat : des analogues du substrat. Ils peuvent être substrat ou non.



$$KI = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{KI}$$

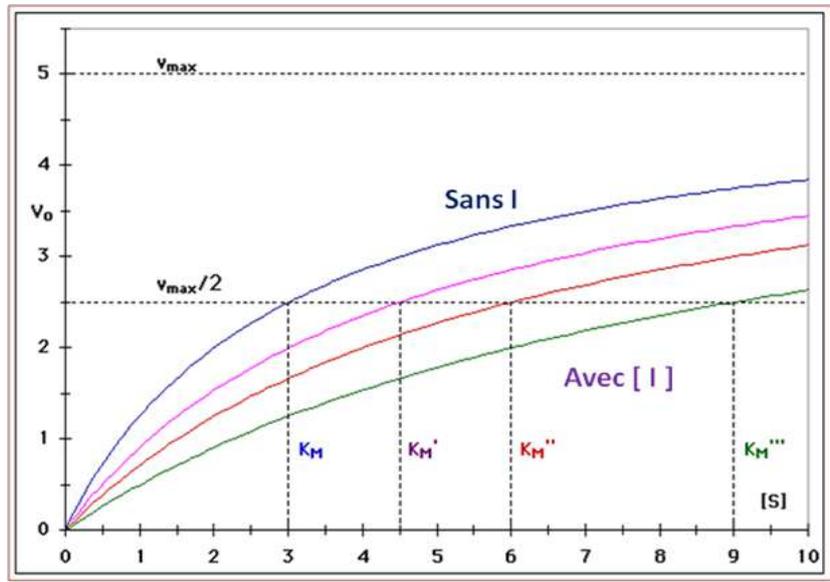
$$[E] = [E]L + [ES] + [EI]$$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M(1+[I]/KI) + [S]} = \frac{V_{max} [S]}{K'_M + [S]}$$

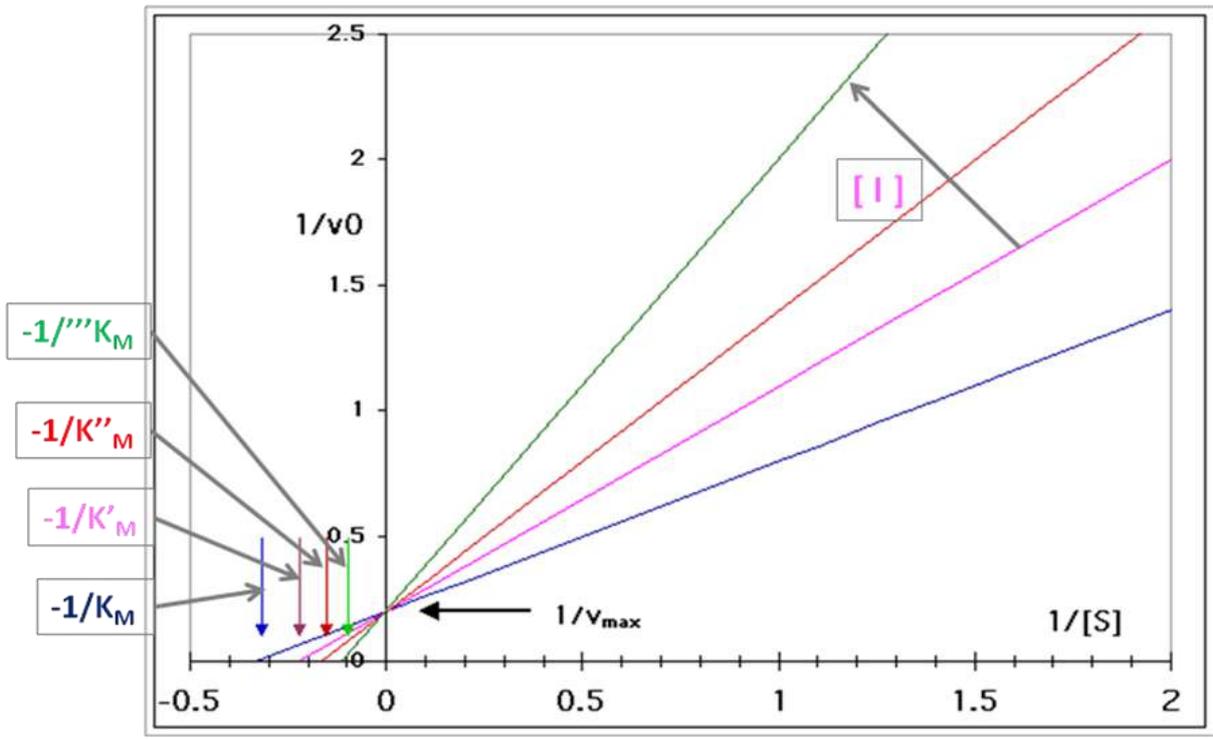
$$K'_M = K_M(1+[I]/KI)$$

$$K''_M = K_M(1+[I]/KI)$$

$$K'''_M = K_M(1+[I]/KI)$$

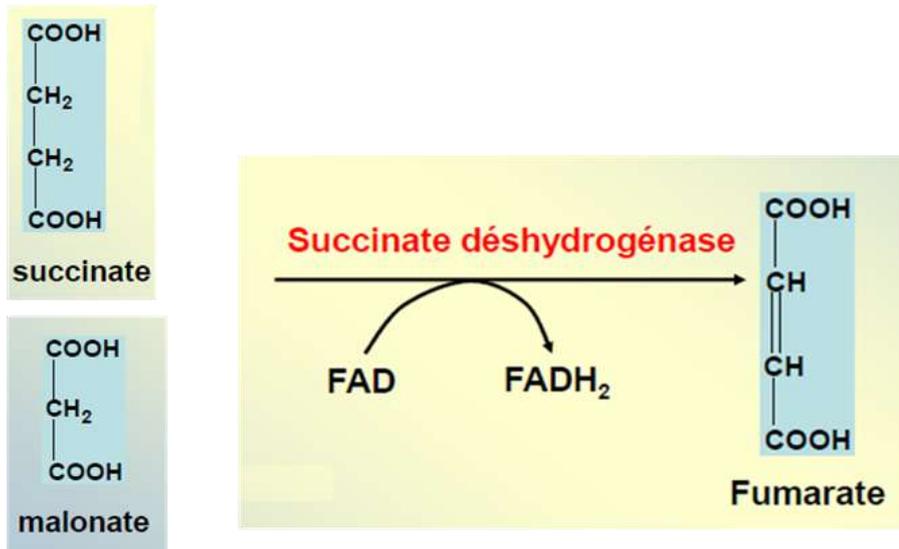


$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{KI}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



L'augmentation de la concentration du substrat : l'effet de l'inhibiteur disparaît ;
 L'inhibition compétitive est levée par excès du substrat : V_{max} n'est pas modifié.

L'exemple : le malonate inhibiteur compétitif du succinate pour la succinodéshydrogénase.

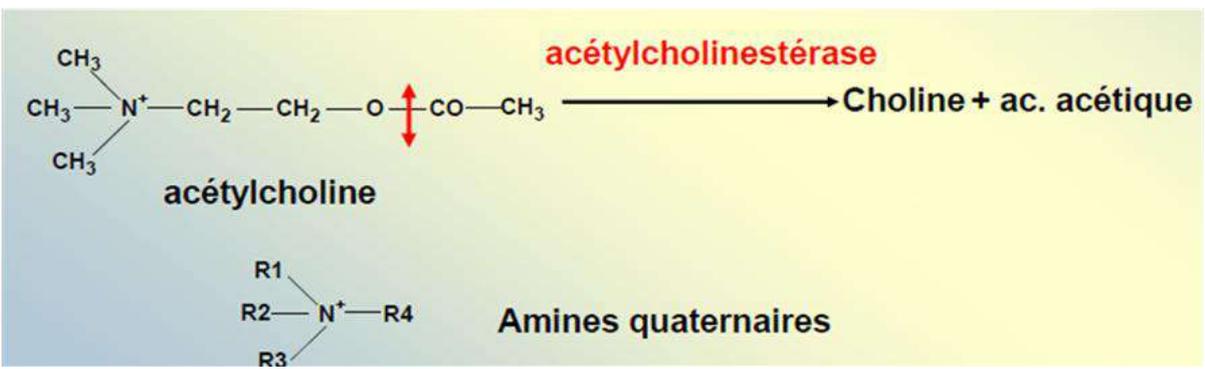


Inhibition par le produit de la réaction



Les amines quaternaires

Sont des inhibiteurs compétitifs de la cholinestérase



Antimétaboliques

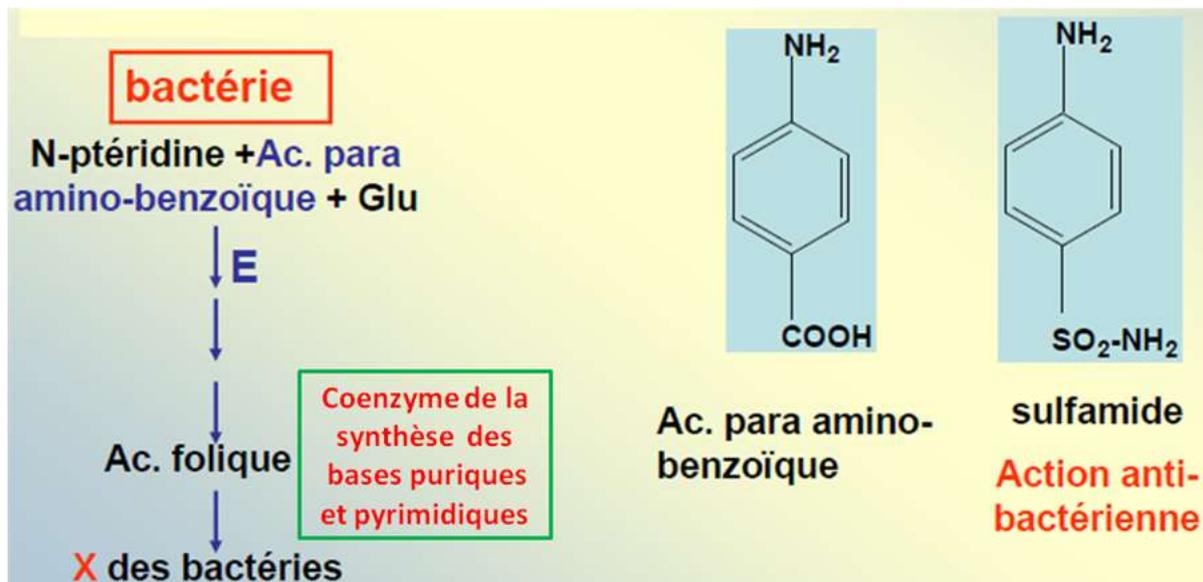
- ✓ Ils agissent principalement sur la synthèse d'ADN ;
- ✓ Ils rentrent en compétition avec les différents nucléotides pour les différentes synthèses ;
- ✓ Ils ont la capacité de s'incorporer dans les divers types d'ARN ;
- ✓ La transcription se fera d'une manière erronée.

fluorouracile

2-amino adénine

Action anti-cancéreuse

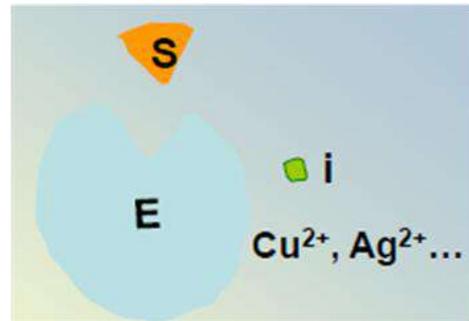
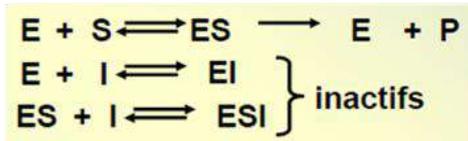
La sulfamide



Combinaison enzyme – effecteur non dépendant du substrat

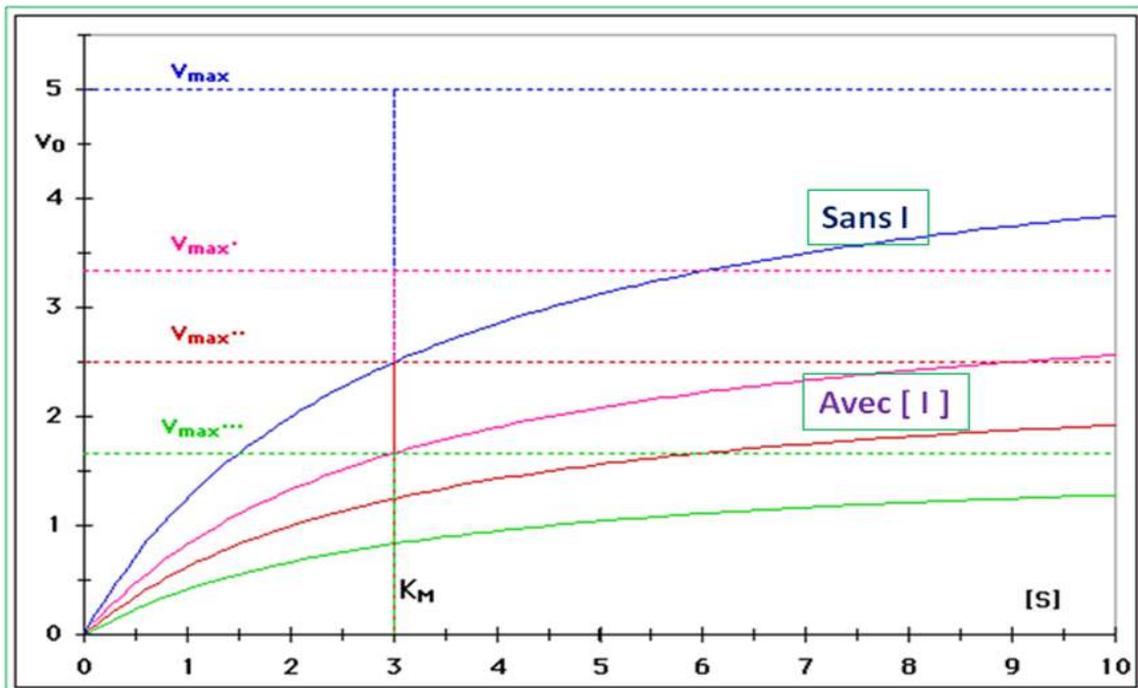
Inhibition non compétitive

Le substrat et l'effecteur se fixent sur des sites différents. Les constantes d'équilibres peuvent être différents selon le type de complexe formé.

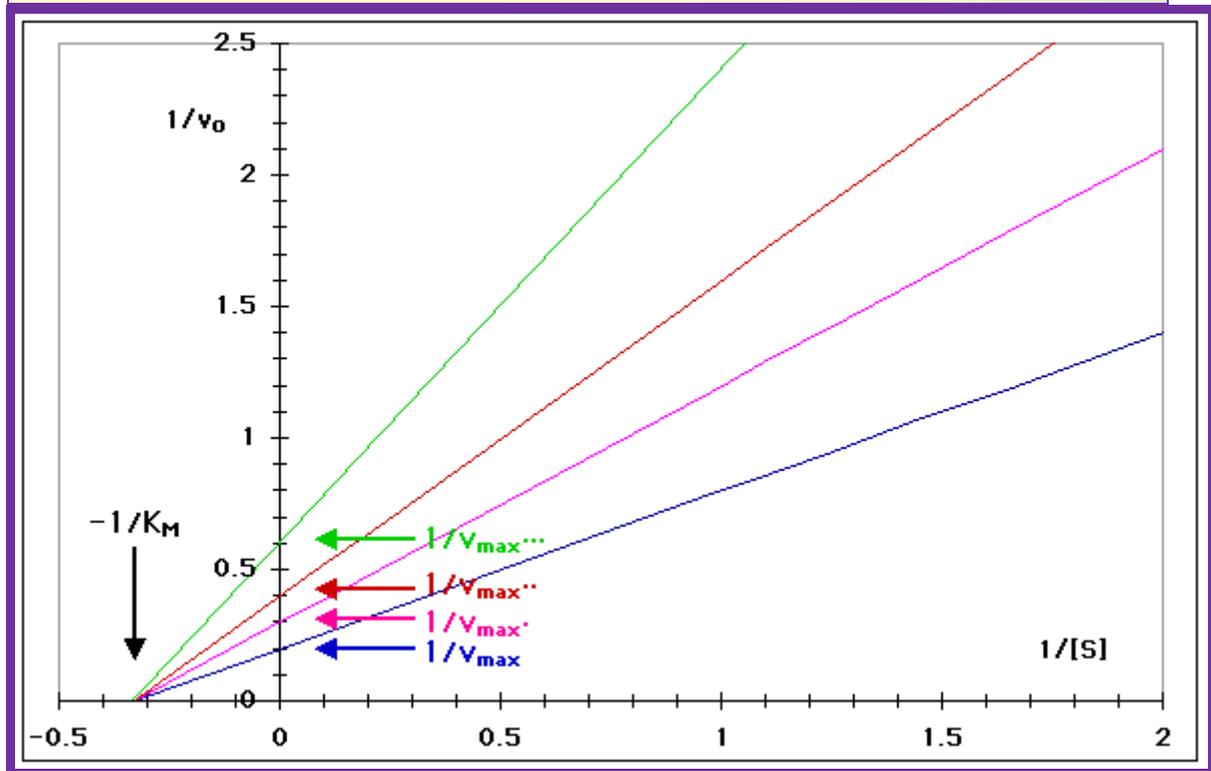


$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$[E] = [E]_L + [ES] + [EI] + [ESI]$$



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} (1 + [I]/K_I) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (1 + [I]/K_I)$$



Ce type d'inhibition n'est pas levé par un excès de substrat

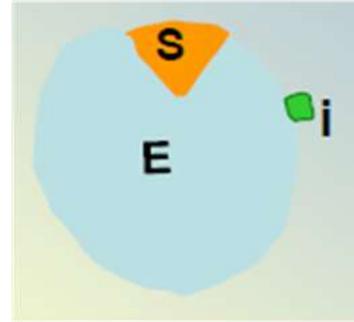
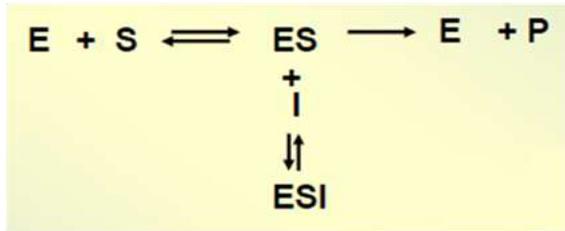
K_M reste inchangé, l'affinité de E pour S n'est pas affectée

Le type le plus courant de cette inhibition : composés capables de se combiner réversiblement avec les groupement SH des radicaux Cystéine indispensables à l'activité enzymatique comme les métaux lourds (Cu^{2+} , Ag^{2+} , Hg^{2+} ,.....)

Certaines enzymes par contre, ont besoin de certains ions comme Mg^{2+} .

Inhibition uncompetitive ou incompétitive

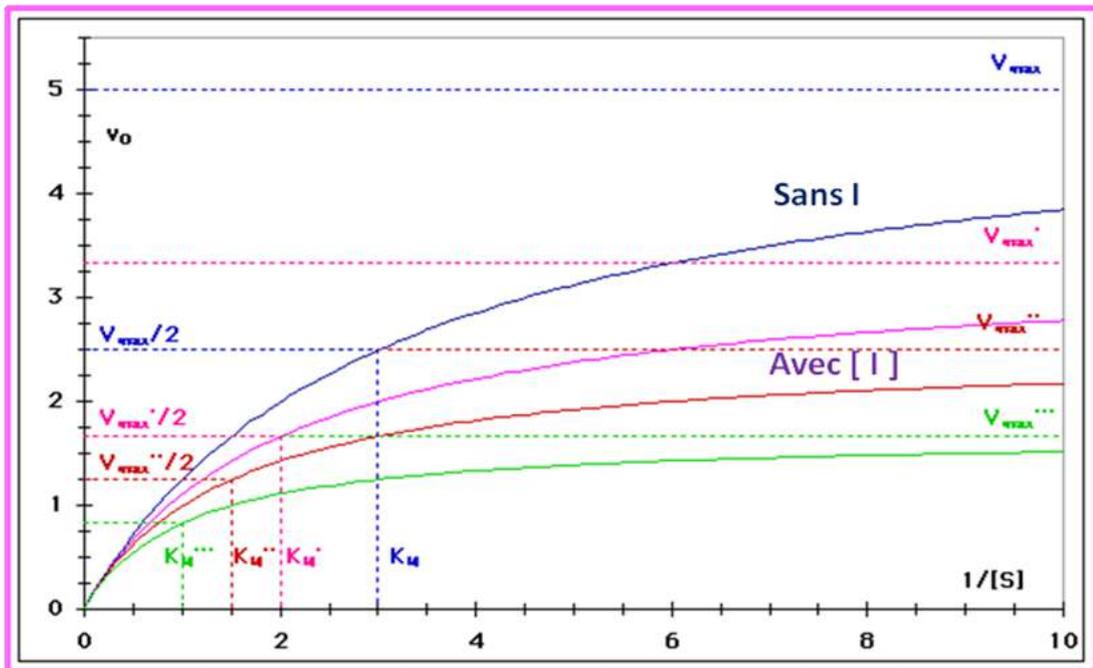
Seul le complexe [ES] présente une affinité pour l'inhibiteur et seul le complexe [ES] est actif.



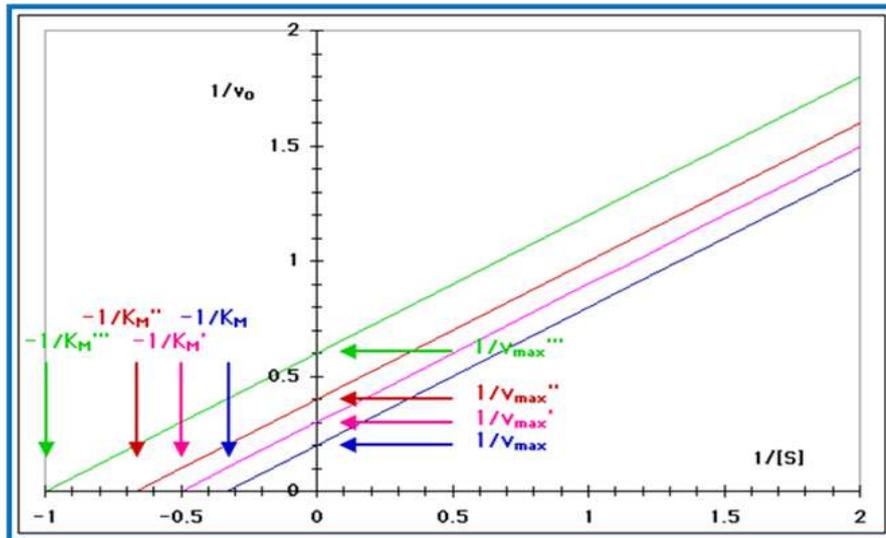
L'inhibiteur ne se lie que sur ES

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{1 + [I]/K_I} \cdot \frac{K_M}{K_M + [S]}$$

$$[E] = [E]_L + [ES] + [ESI]$$



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (1 + [I]/K_I)$$



L' inhibiteur incompétitive diminue K_M et V_{max} .
Cas rare pour les cinétiques à un seul substrat

Inhibition irréversible

Inactivation totale de l'enzyme

Premier Exemple : Iodoacétamide



E – cystéine Iodoacétamide

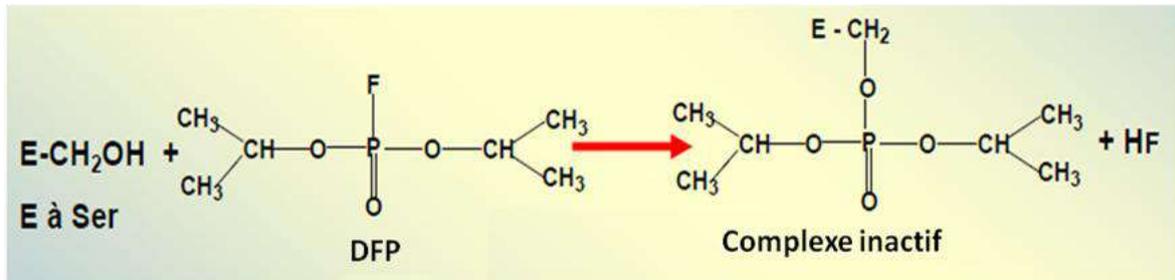
Complexe inactif

L'iodoacétamide est un inhibiteur irréversible de toutes les cystéine peptidases.

Deuxième Exemple : Acide cyanhydrique (HCN) : **Poison respiratoire**

Forme un complexe stable avec le fer des cytochromes (enzymes respiratoires cellulaires) et provoque leur inhibition.

Troisième Exemple : Diisopropyl fluorophosphate (DFP) : Arme Biologique



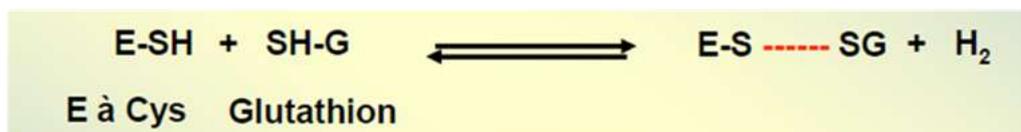
- ✓ C'est une neurotoxine qui agit en inhibant l'acétylcholinestérase ;
- ✓ Arrêt de dégradation de l'acétylcholine : un neurotransmetteur ;
- ✓ Création d'une dépolarisation persistante des synapses par l'acétylcholine ;
- ✓ Création des paralysies (muscles respiratoires) et par conséquent : à la mort.

b). Les activateurs

La majorité des activateurs sont endogènes

Activation par protection de l'enzyme :

Des composés qui protègent les enzymes contre les oxydations dans les enzymes à Cys se comportent comme des activateurs.



Activation par les ions :

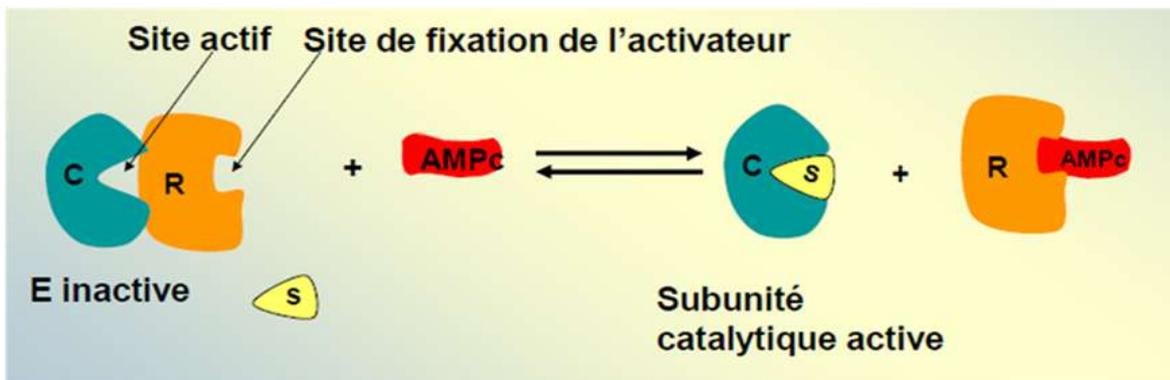
Concerne les enzymes qui nécessitent des ions pour leur activité.

Exemple: Mg^{2+} est un activateur des kinases

Activation par action sur les sous-unités enzymatiques

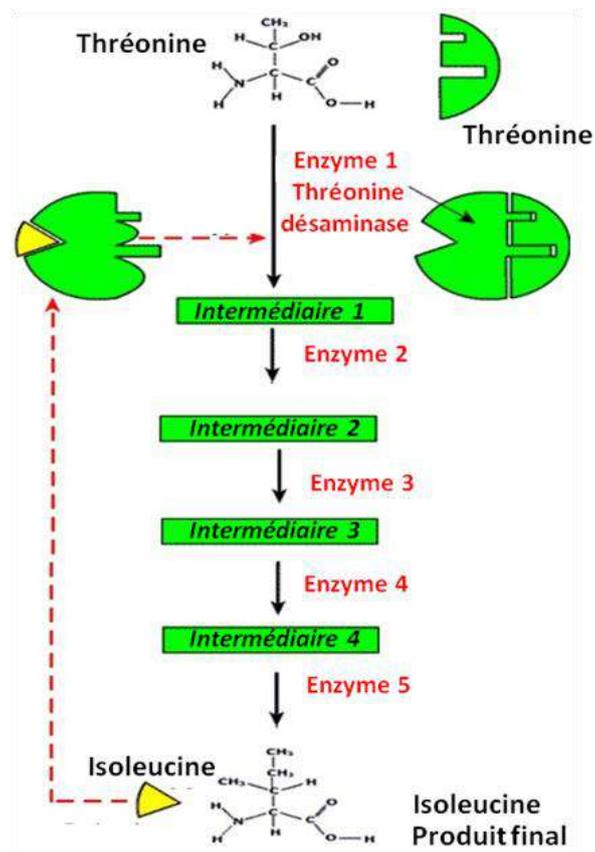


Les protéines kinases sont activées par l'AMPc



3. Effecteurs non Michaeliens

- ✓ Le terme allostérique : proposé en 1964 (MONOS, WYMAN et CHANGEUX)
- ✓ Régulation de la chaîne de biosynthèse des acides aminés ;
- ✓ Allo : autre ; stérique : conformation
- ✓ Le premier enzyme est inhibé par le produit final ;
- ✓ Retro-inhibition ou Feed Back) ;
- ✓ Sites de fixation différents : effecteur et substrat ;
- ✓ Effet non isostérique : allostérique.

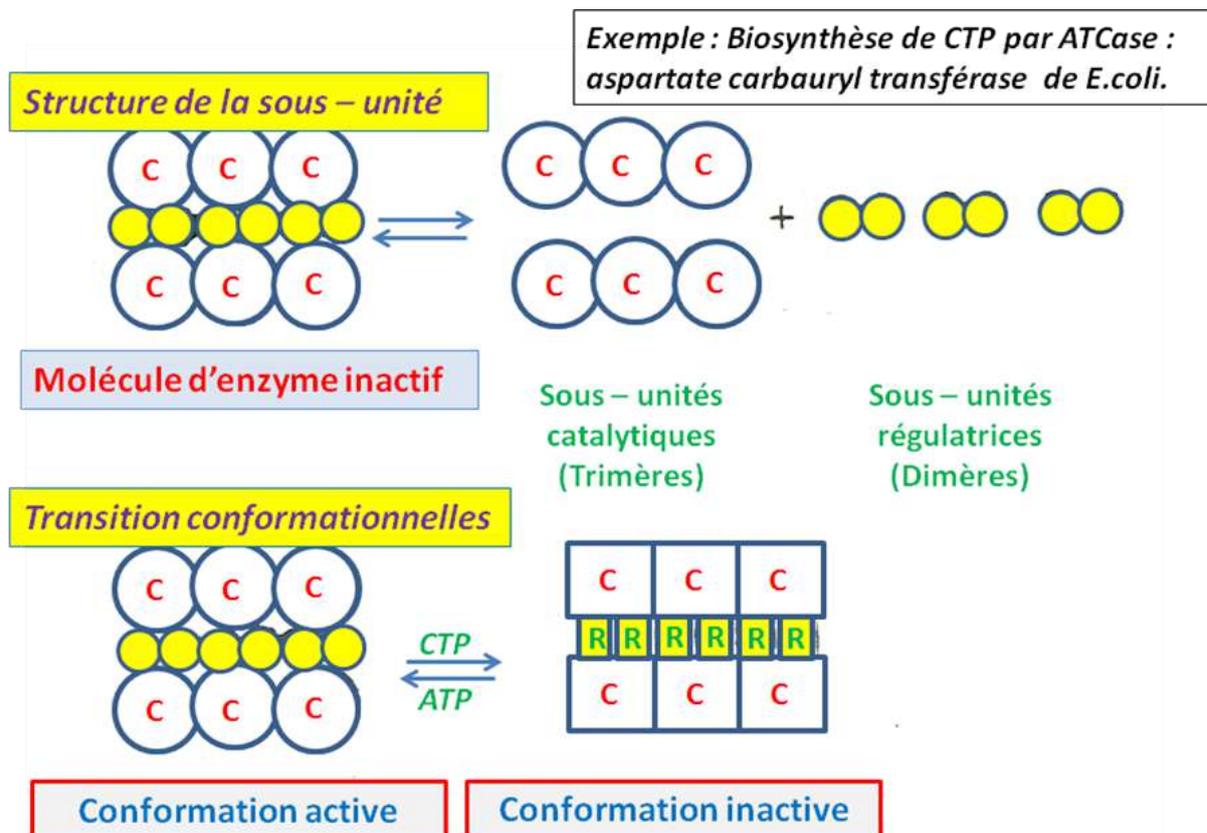


Enzymes allostériques

- Caractéristiques particuliers : structurales et cinétiques
- Enzymes clés du métabolisme : régulation
- Régulation homotrope : l'effecteur est le substrat (O₂ et hémoglobine)
- Régulation hétérotrope : l'effecteur est différent du substrat (cas produit final qui inhibe le premier enzyme)

Caractères structuraux des enzymes allostériques

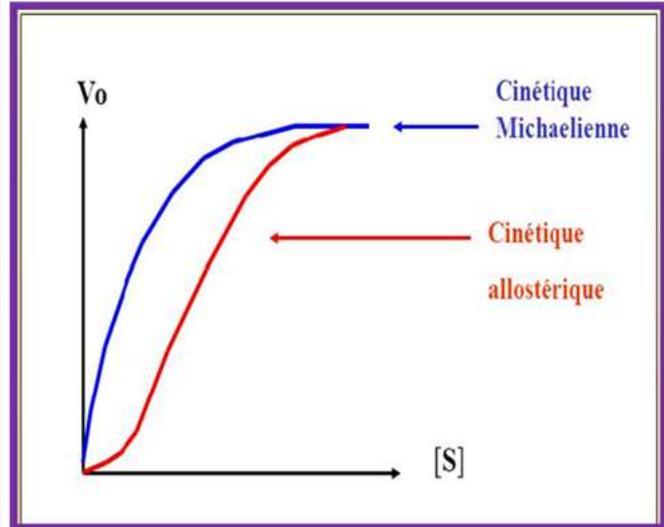
- Enzymes oligomériques : les monomères sont associés par des liaisons ou covalentes.
- Structure quaternaire : ensemble de structures tertiaires
- Formé ; nombre pair de monomères



Caractères cinétique des enzymes allostériques

✓ La courbe de cinétique des enzymes allostériques : sigmoïde ;

- ✓ Aux faibles concentration de substrat la vitesse est faible par rapport aux enzymes Michaeliens ;
- ✓ La vitesse augmente à partir d'un seuil : la fixation d'une première molécule de substrat facilite celles des autres (**Coopérativité positive**)
- ✓ Les enzymes allostériques n'exercent leur action qu'à des concentrations en substrat élevées.



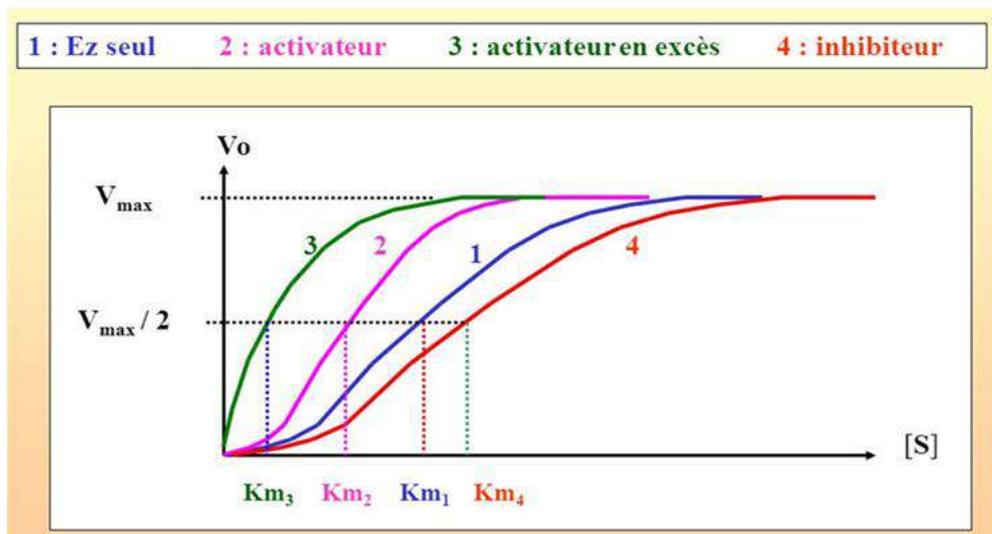
✓ Les effecteurs allostériques : inhibiteurs ou activateurs

Activateurs allostériques

Augmentent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, lui permettant d'agir à de faible concentration en substrat.

Inhibiteurs allostériques

Comme les inhibiteurs non compétitifs diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat.



Equation de HILL



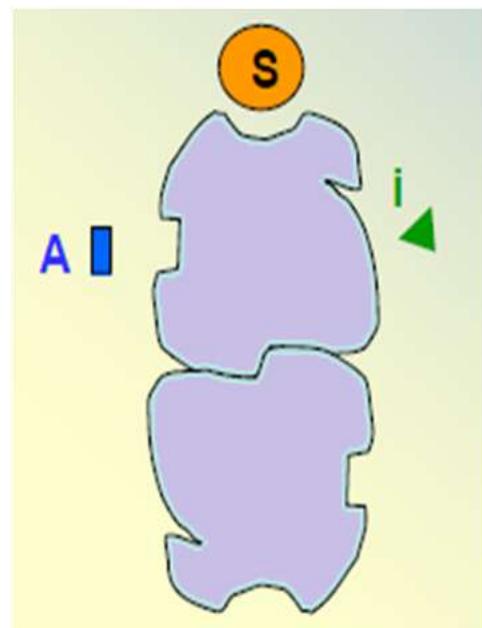
$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{KM}{S_n}}$$

n = Coefficient de HILL : Indice de coopérativité correspond au nombre de sous – unités.

- $n > 1$: coopérativité positive ;
- $n = 1$: absence d'interaction entre les sites ;
- $n < 1$: coopérativité négative (effets antagoniste).

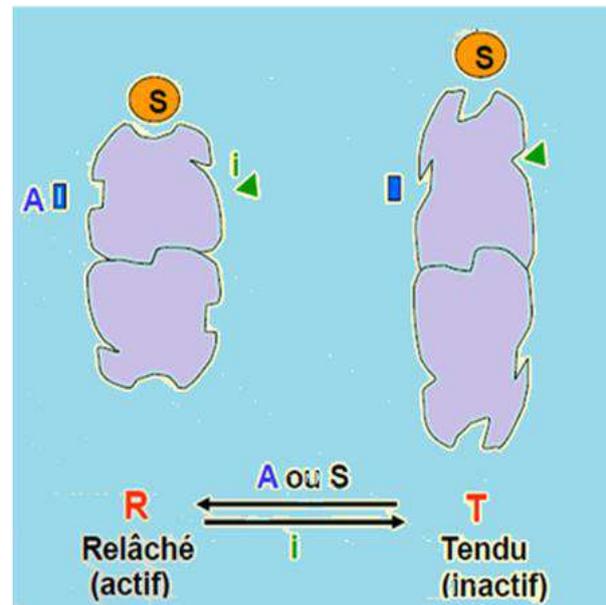
Mécanisme de l'activité régulatrice :

- ✓ La fixation de l'effecteur sur le site crée un changement de conformation de la sous – unité qui se transmet aux autres sous – unités portant le site catalytique : effet coopératif ;
- ✓ En plus du site où se fixe le substrat, l'enzyme possède un ou plusieurs sites allostériques où peuvent se fixer des effecteurs allostériques (activateurs ou inhibiteurs).
- ✓ Ces effecteurs n'ont aucune analogie structurale avec le substrat.



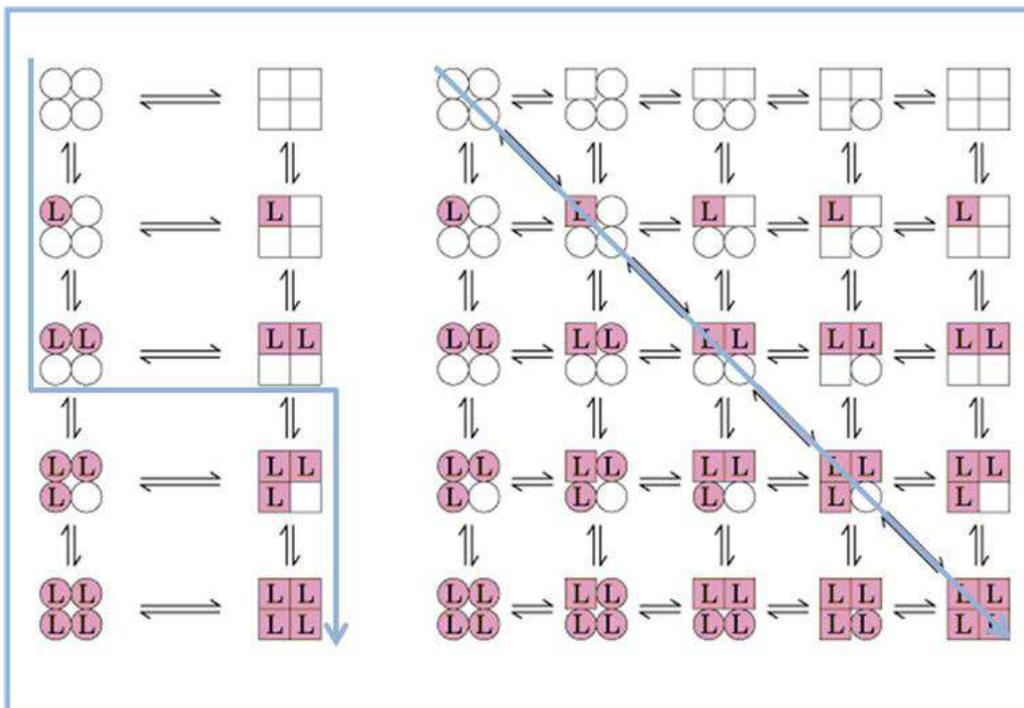
✓ Transition allostérique : l'existence de deux formes :

✓ Les enzymes allostériques existent sous 2 états en équilibre: état catalytique R et état inhibé T ;
 ✓ La fixation d'une molécule de S ou d'un activateur sur le premier site déplace l'équilibre vers la forme active



Cas de coopérativité positive :

- Le substrat fait passer les sous – unités de la forme T à la forme R ;
- Phénomène lent : vitesse faible à faible [S] ;
- Plusieurs modèles de la transition allostérique.



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

